

**Isolierung
der mitochondrialen
Prozessierungs-Peptidase
aus *Neurospora crassa***

Gerhard Hawlitschek-Lohmaier

Disbui. München

1988

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Isolierung
der mitochondrialen
Prozessierungs-Peptidase
aus *Neurospora crassa***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Gerhard Hawlitschek-Lohmaier
aus Burghausen

München
Juni 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen

2. Berichterstatter: PD. Dr. J. Soll

Sondervotum: Prof. Dr. Dr. W. Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 9. 1988

1. Einleitung	1
2. Die Familie	2
3. Die Eltern	3
4. Die Geschwister	4
5. Die Großeltern	5
6. Die Verwandten	6
7. Die Freunde	7
8. Die Hobbys	8
9. Die Reisen	9
10. Die Haustiere	10
11. Die Musik	11
12. Die Sportarten	12
13. Die Berufe	13
14. Die Hobbies	14
15. Die Reisen	15
16. Die Haustiere	16
17. Die Musik	17
18. Die Sportarten	18
19. Die Berufe	19
20. Die Hobbies	20
21. Die Reisen	21
22. Die Haustiere	22
23. Die Musik	23
24. Die Sportarten	24
25. Die Berufe	25
26. Die Hobbies	26
27. Die Reisen	27
28. Die Haustiere	28
29. Die Musik	29
30. Die Sportarten	30
31. Die Berufe	31
32. Die Hobbies	32
33. Die Reisen	33
34. Die Haustiere	34
35. Die Musik	35
36. Die Sportarten	36
37. Die Berufe	37
38. Die Hobbies	38
39. Die Reisen	39
40. Die Haustiere	40
41. Die Musik	41
42. Die Sportarten	42
43. Die Berufe	43
44. Die Hobbies	44
45. Die Reisen	45
46. Die Haustiere	46
47. Die Musik	47
48. Die Sportarten	48
49. Die Berufe	49
50. Die Hobbies	50
51. Die Reisen	51
52. Die Haustiere	52
53. Die Musik	53
54. Die Sportarten	54
55. Die Berufe	55
56. Die Hobbies	56
57. Die Reisen	57
58. Die Haustiere	58
59. Die Musik	59
60. Die Sportarten	60
61. Die Berufe	61
62. Die Hobbies	62
63. Die Reisen	63
64. Die Haustiere	64
65. Die Musik	65
66. Die Sportarten	66
67. Die Berufe	67
68. Die Hobbies	68
69. Die Reisen	69
70. Die Haustiere	70
71. Die Musik	71
72. Die Sportarten	72
73. Die Berufe	73
74. Die Hobbies	74
75. Die Reisen	75
76. Die Haustiere	76
77. Die Musik	77
78. Die Sportarten	78
79. Die Berufe	79
80. Die Hobbies	80
81. Die Reisen	81
82. Die Haustiere	82
83. Die Musik	83
84. Die Sportarten	84
85. Die Berufe	85
86. Die Hobbies	86
87. Die Reisen	87
88. Die Haustiere	88
89. Die Musik	89
90. Die Sportarten	90
91. Die Berufe	91
92. Die Hobbies	92
93. Die Reisen	93
94. Die Haustiere	94
95. Die Musik	95
96. Die Sportarten	96
97. Die Berufe	97
98. Die Hobbies	98
99. Die Reisen	99
100. Die Haustiere	100

Meiner Familie

INHALT

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1. Zucht von <i>Neurospora</i>	7
2.2. Aufschluß der Hyphen	7
2.3. Radioaktive Markierung und Isolierung von Mitochondrien	8
2.3.1. Markierung der Mitochondrien	8
2.3.2. Isolierung der Mitochondrien	8
2.4. Herstellung eines mitochondrialen Tritonextrakts	8
2.5. Reinigung der Prozessierungs-Peptidase	9
2.5.1. DEAE-Cellulose-Chromatographie	9
2.5.2. Zink-Chelat-Chromatographie	9
2.5.3. Polyethylenimin-Cellulose-Chromatographie	10
2.5.4. Polyethylenglycol-Fällung	10
2.5.5. Ecteola-Cellulose-Chromatographie	10
2.6. FPLC Gelfiltration des Eluats der Zn-Chelat-Chromatographie	11
2.7. Proteinsynthese in Lysaten aus Kaninchenretikulozyten	12
2.7.1. Herstellung von Retikulozytenlysaten	12
2.7.2. Isolierung der Poly (A ⁺)mRNA aus <i>Neurospora crassa</i>	13
2.7.3. <i>In vitro</i> -Transkription von klonierter cDNA	14
2.7.4. <i>In vitro</i> -Proteinsynthese	15
2.7.5. Bestimmung der Menge an Vorstufe der ATPase-Untereinheit 2 im translatierten Retikulozytenlysat	16
2.8. Enzymassay	18
2.9. Bestimmung der Proteinkonzentration	19
2.9.1. Bestimmung nach Bradford (1976)	19
2.9.2. Bestimmung nach Bensadoun und Weinstein (1976)	20
2.10. Gelelektrophoretische Trennmethoden	20
2.10.1. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	20

2.10.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese	23
2.10.3. Fixierung und Färbung der Gele mit Coomassie Blue	24
2.11. Immunologische Methoden	24
2.11.1. Herstellung von Antisera	24
2.11.1.1. Aufbereitung der Antigene (nach Knudsen, 1985)	24
2.11.1.2. Immunisierung der Kaninchen	25
2.11.1.3. Gewinnung und Aufbereitung der Sera	25
2.11.1.4. Herstellung von Gammaglobulinen und Immunglobulinen G	25
2.11.1.4.1. Ammoniumsulfatfällung des Serums	25
2.11.1.4.2. Anionenaustausch-Chromatographie	26
2.11.2. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blot, Burnette, 1981) mit anschließender Immundekoration	26
2.11.2.1. Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Peroxydasereaktion	26
2.11.2.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen durch (¹⁴ C)Protein A-Markierung	27
2.11.3. Immunfällung	27
2.12. Messung der Radioaktivität von Proteinen	28
2.12.1. Bestimmung der Radioaktivität einzelner Proteine im SDS-Gel durch Flüssigszintillationszählung	28
2.12.2. Bestimmung der Einbauraten nach <i>in vitro</i> -Translation	28
2.12.3. Bestimmung der Einbaukinetik durch Flüssigszintillationszählung	29
2.12.4. Fluorographie und Autoradiographie	29
2.13. Radiosequenzierung der prozessierten ATPase-Untereinheit 9	29
2.13.1. Prozessierung der ATPase-Untereinheit 9	29
2.13.2. Extraktion der Untereinheit 9-Banden aus dem Gel	29
2.13.3. Radiosequenzierung durch Festphase-Edmanabbau	30
2.14. Chemikalien und Geräte	30

3. ERGEBNISSE 32

3.1. Reinigung der Prozessierungs-Peptidase 32

3.1.1. Prozessierungstest	32
3.1.2. Bestimmung der Enzymaktivität	33
3.1.3. Reinigung des Enzyms	33
3.2. Herstellung spezifischer Antiseren gegen die beiden Komponenten des gereinigten Prozessierungs-Enzyms	42
3.3. Erfordernis von 57 kDa -und 52 kDa-Komponente für die enzymatischen Aktivität	43
3.3.1. FPLC-Gelfiltration	43
3.3.2. Wiedervereinigung nach Trennung beider Komponenten durch Gelfiltration	45
3.4. Präzipitierung der Enzymaktivität mit Immunglobulinen gegen die 57 kDa-Komponente	46
3.5. Die 57 kDa-Komponente trägt das katalytische Zentrum zur hydrolytischen Spaltung von Peptidbindungen	49
3.6. Quantifizierung der 52 kDa-Komponente und 57 kDa-Komponente in den Mitochondrien	54
3.6.1. Immunfällung aus Mitochondrien von (³⁵ S)Sulfat-markierten Zellen	56
3.6.2. Immunfällung aus Mitochondrien von (³ H)Leucin-markierten Zellen	56
3.7. Charakterisierung der gereinigten Prozessierungs-Peptidase	56
3.7.1. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Ionenstärke	57
3.7.2. Einfluß von zweiwertigen Metallionen auf die Prozessierungsaktivität	57
3.7.3. Prozessierung verschiedener Vorstufenproteine durch die isolierte Prozessierungs-Peptidase	60
3.7.3.1. Prozessierung authentischer mitochondrialer Vorstufen	60
3.7.3.2. Prozessierung eines kernkodierten Chloroplasten-Vorstufenproteins	60
3.7.3.3. Prozessierung eines Fusionsproteins	62
3.7.4. Prozessierung verschiedener Vorstufenproteine durch immunpräzipitiertes 57 kDa-Protein	64
3.7.5. Prozessierung der Vorstufe der ATPase-Untereinheit 9: Bestimmung der Schnittstelle durch Radiosequenzierung	64
3.8. Biogenese der Prozessierungs-Peptidase	68
3.8.1. <i>In vitro</i> -Translation der Vorstufen der	

52 kDa -und 57 kDa-Proteine	68
3.8.2. Prozessierung der Vorstufen der 52 kDa -und 57 kDa-Proteine durch die Prozessierungs-Peptidase	68
3.9. Beziehung zwischen dem 52 kDa-Protein und dem Mas 1-Protein aus Hefe	69
4. DISKUSSION	71
4.1. Die Reinigung der Prozessierungs-Peptidase: technische Aspekte	71
4.2. Erfordernis von zwei Komponenten für Prozessierung mitochondrialer Vorstufenproteine: Mitochondriale-Prozessierungs-Peptidase (<i>MPP</i>) und Prozessierung-stimulierendes Protein (<i>PSP</i>)	72
4.3. Interaktion der beiden Komponenten <i>MPP</i> und <i>PSP</i> bei der Prozessierung - Hypothese zum Prozessierungsmechanismus	73
4.4. Spezifität des mitochondrialen Prozessierungsenzyms	75
4.5. Beteiligung weiterer Prozessierungsenzyme an der Spaltung von mitochondrialen Vorstufen mit komplexen Präsequenzen	79
4.6. Beziehung des Prozessierung-stimulierenden Proteins <i>PSP</i> zum Mas 1-Genprodukt von Hefe	80
4.7. Evolution von an der Translokation von Proteinen beteiligten Prozessierungspeptidasen	82
5. ZUSAMMENFASSUNG	84
6. ABKÜRZUNGEN	86
7. LITERATURVERZEICHNIS	88

1. EINLEITUNG

In der lebenden Zelle läuft eine Vielzahl chemischer Reaktionen ab, die den Erhalt der Zelle und deren funktionelle Einheit gewährleisten sollen. Sehr komplexe, häufig vernetzte Reaktionen führen zum Auf-oder Abbau von Makromolekülen, oder dienen der Energiegewinnung der Zelle. Die räumliche Trennung verschiedener Prozesse durch Errichtung unterschiedlicher Kompartimente schafft die Grundlage für den geordneten und effektiven Ablauf dieser Vorgänge. Einerseits gelingt es dadurch, einzelne Substrate an definierten Stellen innerhalb der Zelle zu konzentrieren, andererseits bietet sich damit auch die Möglichkeit, gezielt regulatorisch auf einzelne Prozesse einzuwirken. Die Kompartimentierung ist unterschiedlich stark ausgeprägt bei Prokaryonten (Zytosol, Plasmamembran, Periplasma, Außenmembran) und Eukaryonten (Kern, Zytosol, endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, sekretorische und verwandte Vesikel, Peroxisomen, Glyoxisomen, Mitochondrien, Plastiden, Vakuolen, Plasmamembran u.a.). Die einzelnen Kompartimente weisen jeweils ein hochspezifisches Lipid- und Proteinemuster auf. Die Aufrechterhaltung dieser Spezifität stellt an die Zellen erhebliche Anforderungen. Für ein Verständnis der Mechanismen, die zur Erzielung und Wahrung dieser Identität führen, ist von Bedeutung, daß die Synthese der Proteine, der essentiellen Funktionsträger aller subzellulären Kompartimente, nahezu ausschließlich im Zytosol stattfindet. Selbst im Fall der Mitochondrien und Chloroplasten, die über eigene Genome verfügen und selbständig Proteinbiosynthese durchführen können (Locker und Rabinowitz, 1976; Hay et al., 1984; Harme und Neupert, 1985; Tobin und Silberthorne, 1985; Tzagoloff und Myers, 1986), werden ca. 90% der Proteine vom Kerngenom kodiert und an zytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert. Es müssen also Mechanismen existieren, die dafür sorgen, daß diese Proteine spezifisch in die entsprechenden Kompartimente gelangen können und dort gegebenenfalls zu funktionellen supramolekularen Komplexen vereinigt werden.

Diese Vorgänge sind von beträchtlicher Komplexität. Um spezifisch in das Zielorganell transportiert zu werden, müssen neu synthetisierte Proteine definierte Erkennungssignale besitzen, die mit komplementären Strukturen eines Translokationsapparates wechselwirken. Auch aus thermodynamischer Sicht stellt dieser Transfer über Membranen für "lösliche" hydrophile Proteine ein nicht unerhebliches Problem dar. Spezifische intra -oder interorganelle Sortierung ist erforderlich zur korrekten funktionellen Lokalisierung.

Die Mechanismen der Sortierung, Translokation oder Assemblierung sind in vielfacher Hinsicht untersucht worden. Daran beteiligte Komponenten wurden in einigen

Fällen beschrieben und isoliert. Für die Translokation von neu synthetisierten Vorstufenproteinen wurden zwei anscheinend grundsätzliche verschiedene Mechanismen beschrieben:

1) Kotranslatationaler Transport wird in der Regel bei der Translokation über die Membran des endoplasmatischen Retikulums beobachtet. Proteinbiosynthese und Translokation über die Membran sind in diesem Fall mechanistisch gekoppelt. Proteine des endoplasmatischen Retikulums (ER), und solche, die von dort aus in andere Kompartimente gelangen (Golgi-Apparat, Lysosomen, Speichervesikel, Vakuolen, Plasmamembran, Extrazellulärraum; Pfeffer und Rothman, 1987) werden zunächst an freien zytosolischen Polysomen bis zu einer Länge von ca. 70 Aminosäuren synthetisiert. Die durch seine 54 kDa-Proteinkomponente vermittelte Bindung des löslichen Signalerkennungspartikels (SRP = Signal recognition particle) an diese Signalsequenz führt zu einem Elongationsstop oder zumindest zu einer Verlangsamung der Elongation (Walter und Blobel 1980, Kurzchalia et al., 1986; Wiedman et al., 1987a; Siegel und Walter, 1988). SRP ist ein Ribonukleoprotein, bestehend aus einer 7S RNS und sechs verschiedenen Polypeptiden. Es entsteht ein Komplex aus Polysomen, naszierendem Polypeptid und SRP, der vom sog. "Docking-protein" (DP) gebunden wird. Dieser Rezeptor ist eine Membrankomponente des endoplasmatischen Retikulums. Er besteht aus zwei Polypeptiden (Tajima et al., 1986), von denen eines eine zytoplasmatische Domäne besitzt, die für die Bindung verantwortlich ist. Danach dissoziiert SRP aus dem nun membrangebundenen Komplex, die Proteinsynthese wird fortgeführt und das naszierende Polypeptid ins ER-Lumen sezerniert. Am Translokationsvorgang scheinen neben SRP und DP noch andere Komponenten beteiligt zu sein. So wurde vor kurzem eine angereicherte mikrosomale Membranfraktion beschrieben, die Ribosomen des Komplexes bindet (Hortsch et al., 1986; Yoshida et al., 1987). Außerdem wurden Signalsequenz-Rezeptoren für aminoterminal Signalpeptide der Vorstufenproteine (Wiedman et al., 1987b; Robinson et al., 1987) identifiziert. An der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums ist die Signalpeptidase verankert, die das Signalpeptid der translozierten Proteine abspalzt. Diese Protease wurde in den letzten Jahren charakterisiert (Kaschnitz und Kreil, 1978; Jackson und White, 1981; Lively und Walsh, 1983) und angereichert (Baker et al. 1986; Evans et al., 1986). Eine von der Funktion her äquivalente Protease, die Leader Peptidase, existiert bei Prokaryonten. Sie wurde bereits 1980 aus *Escherichia coli* gereinigt (Zwizinski und Wickner, 1980) und intensiv charakterisiert (Wolfe et al., 1983a). In *Escherichia coli* wurde mit der Prolipoprotein Signal Peptidase eine weitere Proteinase dieser Art gefunden, die spezifisch die Präsequenzen der Lipoproteine abspalzt (Tokunaga et al., 1984; Dev und Ray, 1984).

2) Posttranslationaler Transport wurde für Proteine der Mitochondrien, Plastiden, Peroxisomen und Glyoxisomen beschrieben. Eine mechanistische Kopplung zwischen Translation und Translokation ist hier nicht gegeben. Kernkodierte mitochondriale Proteine werden zunächst als Vorstufen vollständig im Zytoplasma synthetisiert und anschließend in das Organell transportiert. Sie werden von spezifischen Rezeptoren an der Außenmembran gebunden (Zwizinski et al., 1983; Pfaller et al., 1985; Pfaller und Neupert, 1987) und über Translokations-Kontaktstellen zwischen Außen- und Innenmembran (Schleyer und Neupert, 1985) in die mitochondriale Matrix transloziert (Hartl et al., 1986; 1987). Zwischenstufen bei der Translokation eines integralen Innenmembranproteins, des ADP/ATP-Carriers, wurden beschrieben (Pfanner und Neupert, 1987). Dieses (wie auch andere) Vorstufenprotein interagiert dabei hintereinander mit mehreren unterschiedlichen Komponenten des Translokationsapparates. Einige Beobachtungen lassen vermuten, daß es sich bei den Komponenten um Proteine handeln muß (Pfanner et al., 1987a). Die Translokation erfolgt in Abhängigkeit des Membranpotentials über die Innenmembran (Schleyer et al, 1982; Pfanner und Neupert, 1985). Proteine, die nicht über die Innenmembran transportiert werden, wie Apocytochrom c, oder Proteine der mitochondrialen Außenmembran, wie Porin, benötigen für den Transport kein Membranpotential (Zimmermann et al., 1981, Freitag et al., 1982; Gasser und Schatz, 1983). Vor kurzem konnte demonstriert werden, daß der Import in Mitochondrien zusätzlich zum Membranpotential die Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten erfordert (Chen und Douglas, 1987; Eilers et al., 1987; Pfanner et al., 1987b). Auch für den Proteintransport in Chloroplasten (Flügge und Hinz, 1986; Pain und Blobel, 1987), ins endoplasmatische Retikulum (Hansen et al., 1986; Rothblatt und Meyer, 1986; Waters und Blobel, 1986) und für die Sekretion bakterieller Proteine (Chen und Tai, 1985) wurde eine Abhängigkeit von Nukleosidtriphosphaten gezeigt. Experimentelle Befunde lassen vermuten, daß für die Translokation eine "Entfaltung" der Vorstufen notwendig ist (Eilers und Schatz, 1986; Schleyer und Neupert, 1985), und daß Nukleosidtriphosphate bei dieser proteinvermittelten Entfaltung eine Rolle spielen.

Man konnte beobachten, daß mehrere Proteine des Intermembranraums zunächst als Vorstufen vollständig in die Matrix der Mitochondrien transloziert werden, bevor sie schließlich zu ihrem endgültigen Funktionsort im Intermembranraum oder an der Intermembranraumseite der Innenmembran gelangen (Hartl et al., 1986; 1987). Von der Matrix aus werden diese Proteine nach Abspaltung eines Teils ihrer komplexen Präsequenz durch eine Prozessierungs-Peptidase über die Innenmembran rücktransloziert. (Hartl et al., 1986; 1987).

Für den spezifischen Transport in das Mitochondrium und die intramitochondriale Sortierung sind die N-Termini der Vorstufenproteine von entscheidender Bedeutung. Sie



enthalten ausreichend Ziel-Information für den Eintransport von Vorstufen in die Matrix (Hurt et al., 1984, 1985; Horwich et al., 1985a; Horwich et al., 1986; Emr et al., 1986; Keng et al., 1986; Vassarotti et al., 1987b). In der Matrix werden die aminoterminalen Extrasequenzen durch die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase abgespalten. Vollständiger Eintransport der Vorstufenproteine kann freilich auch ohne Entfernung der Präsequenzen erfolgen, z.B. in Mitochondrien, deren Prozessierungs-Peptidase gehemmt ist (Zwizinski und Neupert, 1983; Lewin und Norman, 1983; Hartl et al., 1986; Ou et al., 1986). Für die korrekte Assemblierung der Proteine in die funktionellen supramolekularen Komplexe ist die proteolytische Abspaltung der Präsequenz aber Voraussetzung.

Proteine des Intermembranraums werden zweistufig prozessiert. Die aufeinanderfolgenden Prozessierungsschritte werden von unterschiedlichen Proteasen und in verschiedenen intramitochondrialen Kompartimenten ausgeübt. Die erste Spaltung erfolgt durch die Prozessierungs-Peptidase. Für die zweite Spaltung, die für Cytochrom b₂ und Cytochrom c₁ im Intermembranraum stattfindet, gibt es mehrere Proteasen mit unterschiedlicher Substratspezifität (Pratje et al., 1983; Pratje und Guiard, 1986). Vor der endgültigen Assemblierung können weitere Modifizierungen stattfinden, wie der Einbau einer Hämgruppe beim Cytochrom c₁ oder die Ausbildung eines Eisen-Schwefel Zentrums beim "Rieske" Fe/S Protein.

Die beteiligten proteolytischen Enzyme, die die Abspaltung der N-terminalen Signalpeptide katalysieren, stellen eine eigene Klasse von Proteasen dar und unterscheiden sich von der Vielzahl anderer intrazellulärer Proteasen. Insbesondere unterscheiden sie sich von den unspezifischen Proteasen, die viele verschiedene Proteine abbauen können. Solche Proteasen sind häufig in eigenen Kompartimenten wie Lysosomen oder Vakuolen lokalisiert. Andere, existieren als lösliche Komponenten proteolytischer Systeme im Zytoplasma. Dazu zählen proteolytische Enzymkomplexe in Prokaryonten (Swamy und Goldberg, 1981), sowie ATP/Ubiquitin- und Ca⁺⁺-abhängige Proteasen bei Eukaryonten (Pontremoli und Melloni, 1986). Bei letzteren vermittelt Ca⁺⁺ die Aktivierung inaktiver Vorstufen. Dabei kommt es zur Dissoziation von Komplexen, Autoproteolyse und Membranassoziation (Mellgren, 1987). Die Aktivität der ATP/Ubiquitin-abhängigen Proteasen wird offenbar durch Signale im abzubauenen Protein selbst reguliert. So erhöht die kovalente Modifizierung löslicher Proteine mit Ubiquitin deren ATP-abhängigen Abbau in Retikulozyten (Hershko et al., 1980; Hough et al., 1986). Nach der N-End-Regel (Bachmair et al., 1986) ist die Halbwertszeit eines Proteins eine Funktion der aminoterminalen Aminosäure. Die sog. PEST-Hypothese (Rogers et al., 1986) besagt, daß Proteine, die in Zentren gehäuft Prolin, Glutaminsäure, Serin und Threonin enthalten, gute Substrate für den Abbau sind.

Auf der anderen Seite gibt es die äußerst umfangreiche Klasse der intrazellulären Proteasen, die limitierte Proteolyse durchführen. Endopeptidasen wandeln inaktive Proproteine in reife, funktionelle Proteine um. Solche Proteasen treten z.B. bei der Reifung von Peptidhormonen und Wachstumsfaktoren auf. Sie besitzen eine hohe Spezifität, was die Schnittstelle anbelangt und spalten in der Regel hinter einer Sequenz von zwei basischen Aminosäuren, die nur in der jeweiligen Proform des Proteins vorkommt (Schwartz, 1986; Bond und Butler, 1987). Kürzlich wurden auch sog. monobasische Endopeptidasen beschrieben, die hinter einzelnen basischen Aminosäuren spalten (Bostian et al., 1984). Diese befinden sich dabei in unmittelbarer Nachbarschaft von Prolinresten, denen eine spezielle Rolle bei der dreidimensionalen Orientierung des Peptidbindungs-Rückgrats bezüglich des aktiven Zentrums der Protease zugesprochen wird.

In dieser Klasse von Proteasen befinden sich die Signal-Peptidase des endoplasmatischen Retikulums, die Leader-Peptidase der Prokaryonten und auch die mitochondrialen Signalpeptidasen. Diese spalten jeweils nur eine einzige Peptidbindung im gesamten Protein.

Die enzymatische Aktivität, die für die Entfernung aminoterminaler Präsequenzen mitochondrialer Vorstufenproteine verantwortlich ist, wurde zunächst in Extrakten von Hefemitochondrien gefunden (Böhni et al., 1980; McAda und Douglas, 1982). Später entdeckte man sie in Mitochondrien der Rattenleber (Conboy et al., 1982; Miura et al., 1982), des Brotschimmelpilzes *Neurospora crassa* (Schmidt et al., 1984) und der Nebennierenrinde (Sagara et al., 1985). Wegen ihrer Lokalisierung wurde das Enzym zuerst als "Matrixprotease" und dann genauer als "Matrix-Prozessierungs-Peptidase" bezeichnet. Mehrfach wurde über Versuche zur Anreicherung des Enzyms berichtet. Es wurde jedoch nur eine teilweise Anreinigung erzielt (McAda und Douglas, 1982; Böhni et al., 1983; Sagara et al., 1985; Miura et al., 1986; Kumamoto et al., 1986). Die angereicherten Fraktionen wurden charakterisiert. Die Aktivität war hemmbar durch Metallchelatoren, wie EDTA, ortho -oder batho-Phenanthrolin und aktivierbar durch zweiwertige Metallionen wie Mn^{++} , Zn^{++} , oder Co^{++} . Andere Proteinaseinhibitoren wie PMSF (Hemmstoff von Serinproteinasen), NEM und Jodacetat (Hemmstoffe von Cysteinproteinasen), oder Pepstatin (Hemmstoff von Asparaginsäure-Proteinasen), beeinflussten die enzymatische Aktivität nicht. Die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase spaltete spezifisch nur mitochondriale Vorstufenproteine. Denaturierte Vorstufen wurden nicht gespalten.

Besondere Aufmerksamkeit verdient die beobachtete hohe Spezifität der Prozessierungsreaktion. Präsequenzen werden an einer einzigen Peptidbindung proteolytisch hydrolysiert. Die (bislang nicht bewiesene) Annahme, daß viele verschiedene Vorstufenproteine von der Prozessierungs-Peptidase gespalten werden, wirft eine Reihe von

Fragen auf. Eine wichtige Frage richtet sich auf den molekularen Mechanismus der spezifischen Erkennung. Aus einem Vergleich der Primärstrukturen unterschiedlicher Präsequenzen (Nicholson und Neupert, 1988) ergeben sich nur geringfügige Übereinstimmungen. Bei den meisten findet man gehäuft positiv geladene (Lysin, Arginin), dagegen kaum saure Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure). Außerdem sind hydroxylierte Aminosäuren (Serin, Threonin) häufig. Ein gemeinsames Strukturmerkmal ist die Möglichkeit zur Ausbildung amphipathischer α -Helices oder β -Faltblattstrukturen (von Heijne, 1986a; Roise et al., 1986; Vassarotti et al, 1987b). Es existieren jedoch keine starken Homologien oder gar konservierte Aminosäuren an der Prozessierungsstelle der Protease, wie dies bei den sekretorischen Proteinen der Fall ist (von Heijne, 1984, 1986b; Robinson und Austen, 1987).

Geringfügige Änderungen in diesen Präsequenzen, wie Deletionen weniger Aminosäuren können dennoch die Prozessierbarkeit der Vorstufen unterbinden (Hurt et al., 1987; Nguyen et al., 1987). Strukturelle Eigenschaften von bislang unbekannter Art scheinen maßgeblich für die Prozessierungsreaktion zu sein.

Obwohl die Prozessierungs-Petidase an der Translokation von Vorstufenproteinen über Membranen nicht beteiligt ist, nimmt sie doch auf Grund der für die Assemblierung obligatorischen Prozessierung eine entscheidende Rolle bei der Biogenese der Mitochondrien ein. In diesem Zusammenhang sind ihre Eigenschaften von besonderem Interesse. Es stellen sich eine Reihe von Fragen, so u.a.: Was ist die Basis der bemerkenswerten Spezifität des Enzyms, insbesondere angesichts der extremen Verschiedenheit ihrer Substrate und der Spaltstellen? Existieren mehrere Enzyme, die zwar verwandt sind aber unterschiedliche Vorstufen prozessieren? Wie werden die Vorstufen vom Enzym erkannt? Was ist der molekulare Mechanismus der Prozessierung? Spaltet das Enzym die Präsequenz in einem einzigen Prozessierungsschritt? Wie wird die Prozessierungs-Petidase selbst synthetisiert und gegebenenfalls prozessiert? Welche Ähnlichkeiten oder Unterschiede gibt es zu den anderen "Signalpeptidasen"?

Voraussetzung für die Beantwortung dieser Fragen ist die Verfügbarkeit des Enzyms in reiner Form. Ziel dieser Arbeit war es, erstmalig das Enzym zu isolieren. Als Quelle wurde der Mikroorganismus *Neurospora crassa* gewählt. Das gereinigte Enzym sollte dann hinsichtlich seiner proteinchemischen und katalytischen Eigenschaften charakterisiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Zucht von *Neurospora crassa*

Konidien (Inokulum 1×10^8 /ml, 10 ml/l Kultur) von *Neurospora crassa* (Wildtyp 74 A) wurden wie beschrieben (Korb und Neupert, 1978) unter sterilen Bedingungen in 8 l-Kulturflaschen (oder 1-2 l-Flaschen bei der Isolierung von Mitochondrien) inkubiert. Als Wachstumsmedium wurde Vogel's Minimalmedium mit 2% Saccharose verwendet. Die Inkubationstemperatur betrug 25°C. Während der gesamten Inkubationsdauer wurde die Kultur durch Druckluftzufuhr über einen autoklavierten Filter begast und umgewälzt. Nach 15 h wurden die Hyphen durch Filtration geerntet und bei -20°C aufbewahrt, oder zur Isolierung von Mitochondrien sofort weiterverarbeitet. Die Ausbeute der Hyphen betrug ca. 2-5 g/l Kulturmedium.

2.2. Aufschluß der Hyphen

Zum Aufschluß größerer Mengen von *Neurospora crassa*-Hyphen (200 g) für die Präparation der Prozessierungs-Peptidase wurden diese im 6-fachen Volumen (bezogen auf das Naßgewicht) des Isolierungsmediums (30 mM Tris/HCl, pH 8,2, 0,1 mM PMSF) in einem Waring Blender resuspendiert (60 Sekunden, Stufe "low"). Danach wurde die Suspension nach Korb und Neupert (1978) durch dreimalige Passage durch die von Weiss et al., (1970) beschriebene Zelmühle weiter aufgeschlossen. Ungeöffnete Zellen, Zellkerne oder Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (Rotor JA 10, Beckman Kühltrentrifuge) für 2 h bei 17 700 g_{av} und 40°C entfernt. Der Überstand wurde als Gesamtzellextrakt bezeichnet.

Zur Isolierung von Mitochondrien wurden die Hyphen mit sterilem Quarzsand bei 40°C aufgerieben. Die Zellen wurden pro g Naßgewicht mit 1,5 g Quarzsand und 2,0 ml SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM MOPS, pH 7,2, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF) in einem Porzellanmörser mit einem Pistill 5 min lang aufgerieben. Die Zelltrümmer und der Quarzsand wurden durch Zentrifugation (Rotor JA 20, Beckman Kühltrentrifuge, 2 x 5 min, 2000 g_{av}) entfernt. Der resultierende Überstand, der neben löslichem Zytosol die intakten Mitochondrien enthielt, wurde als Zellhomogenat bezeichnet.

2.3. Radioaktive Markierung und Isolierung von Mitochondrien

2.3.1. Markierung der Mitochondrien

Zur radioaktiven Markierung und Isolierung von Mitochondrien wurde der unter 2.1. beschriebene Ansatz in 1-2 l-Kulturen durchgeführt.

Zum Einbau von radioaktivem Schwefel (^{35}S) in mitochondriale Proteine wurden die Hyphen in sulfatarmem Minimalmedium (0,08 mM MgSO_4) angezogen, das als Schwefelquelle (^{35}S)Sulfat (NEN, 0,4-1 Ci/mMol pro l) enthielt (Hallermaier et al., 1977). Nach 15 h Wachstumsdauer wurden die Hyphen geerntet.

Zur Tritiummarkierung wurden der Kultur nach 13-stündigem Wachstum 5 mCi (^3H)Leucin zugesetzt (NEN, 40-60 Ci/mMol in 0,01 N HCl-Lösung). Danach wurde die Kultur weitere 2 h lang unter Standardbedingungen inkubiert, bevor die Hyphen geerntet wurden.

2.3.2. Isolierung der Mitochondrien

Die Mitochondrien wurden aus dem Zellhomogenat markierter oder unmarkierter Hyphen durch Zentrifugation bei 17 300 g_{av} (Rotor JA 20, Beckman Kühltzentrifuge) für 12 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Mitochondrienpellet in einer Konzentration von 5 mg/ml in SEM resuspendiert. Aliquots á 20 μl wurden wie vorher durch Zentrifugation pelletiert. Die Überstände wurden abgenommen und die mitochondrialen Niederschläge (= 100 μg) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

2.4. Herstellung eines mitochondrialen Tritonextrakts

100 μg eines Mitochondrienniederschlags wurden mit 100 μl eines Triton X-100 enthaltenden Puffers (30 mM Tris, pH 8,2, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM PMSF) 15 min in der Kühlbox bei 4°C auf einem Eppendorfschüttler (Mixer 5432) solubilisiert. Nicht gelöste Membranbestandteile wurden 15 min bei 17 300 g_{av} (Rotor JA 20, Beckman Kühltzentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wurde als mitochondrialer Tritonextrakt bezeichnet.

2.5. Reinigung der Prozessierungs-Peptidase

Alle Reinigungsschritte wurden bei 40°C durchgeführt. Die Elution der Proteine bei verschiedenen chromatographischen Schritten wurde mit einem UV-Monitor (UV 1, Pharmacia) verfolgt.

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung der Protease dienten 200 g *Neurospora crassa*-Hyphen (Naßgewicht), die bei -20°C aufbewahrt waren. Die spezifische Aktivität des Enzyms verringerte sich unter diesen Bedingungen selbst bei Lagerzeiten von mehreren Monaten nicht. Die Hyphen wurden, wie in 2.2.1. beschrieben, zu einem Gesamtzellextrakt aufbereitet. 200 g Hyphen ergaben eine Menge von 16-18 g Gesamtprotein. Dieses wurde durch folgende Schritte bis zur Homogenität des Enzyms angereichert:

2.5.1. DEAE-Cellulose-Chromatographie

Der Gesamtzellextrakt, dessen pH durch Titration mit HCl_{konz} auf 7,5 eingestellt war, wurde im ersten Schritt durch eine Anionenaustausch-Chromatographie an DE 52 (Whatman) angereichert. Die funktionelle Gruppe dieses Anionenaustauschers ist "Diethylaminoethyl". Die Säule wurde äquilibriert mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5. Das Auftragsvolumen betrug 1,3 l, bei einem Säulenvolumen von 170 ml (2,5 x 35 cm). Die Flußrate war 3,3 ml/min. Nach dem Auftrag wurde die Säule gewaschen mit 1,4 l des Äquilibrierungspuffers und eluiert mit einem linearen Gradienten steigender Salzkonzentration (0-300 mM NaCl, in 1,7 l des Äquilibrierungspuffers). 85 Fraktionen á 20 ml wurden gesammelt und für jede 5. Fraktion ab Fraktion Nr.40 wurde die Prozessierungsaktivität bestimmt. Die Prozessierungsaktivität wurde zwischen Fraktion Nr.45 und 70 eluiert. Diese Fraktionen wurden vereinigt.

2.5.2. Zink-Chelat-Chromatographie

Zur Bindung von Zinkionen wurde über eine gepackte Metallchelate-Affinitäts-Sepharose 6B (2,5 x 20 cm, Pharmacia) eine wässrige ZnCl_2 -Lösung (5% ig) mit einer Flußrate von 2,5 ml/min gepumpt. Durch Bindung der Zinkionen wurden Protonen von den funktionellen Carboxylresten der Matrix verdrängt, sodaß der pH des Durchlaufs während des Beladevorgangs sank (bis ca. pH 2). Im Verlauf der weiteren Zn^{++} -Beladung stieg der pH wieder an und erreichte bei Zinksättigung der Matrix annähernd den Neutralpunkt. Überschüssige Metallionen wurden durch Waschen mit 200 ml H_2O idest entfernt. Anschließend wurde die Säule mit 30 mM Tris/ PO_4 , pH 7,0, 200 mM NaCl äquilibriert.

Die aktiven Fraktionen nach DEAE-Cellulose-Chromatographie wurde auf die äquilibrierte Zn-Chelat-Affinitäts-Sepharose 6B aufgetragen (Flußrate: 2,5 ml/min). Die Säule wurde dann mit 800 ml des Äquilibrierungspuffers gewaschen und mit einem linearen Gradienten (Gesamtvolumen des Gradienten = 1 l) von 0 - 30 mM Histidin in 10 mM Tris/PO₄, pH 7,0, 200 mM NaCl eluiert. 50 Fraktionen á 20 ml wurden gesammelt. Die Elution der Masse der Proteine begann nach etwa 20 Fraktionen. Von dieser Fraktion an wurde die Aktivität jeder 4. Fraktion gemessen. Die Prozessierungs-Peptidase wurde in der abfallenden Flanke des Proteinpeaks eluiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt.

2.5.3. Polyethylenimin-Cellulose-Chromatographie

Polyethylenimin (PEI)-Cellulose (Sigma) wurde in einer Säule (2,5 x 10 cm, V = 50 ml) äquibriert mit 10 mM Tris/PO₄, pH 7,0, 100 mM NaCl. Die aktiven Fraktionen der Zn-Chelat-Affinitätssäule wurde mit dem selben Volumen H₂O_{bidest} verdünnt, sodaß die NaCl-Konzentration 100 mM war, und auf die Säule mit einer Flußrate von 2,5 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde mit 250 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen und mit 500 ml eines linearen Gradienten ansteigender Phosphatkonzentration (10-100mM Tris/PO₄) bei konstanter NaCl-Konzentration eluiert. 50 Fraktionen á 10 ml wurden gesammelt, Aliquots zur Bestimmung der Prozessierungsaktivität entnommen und der Rest der Fraktionen sofort einer Polyethylenglycol-Fällung unterzogen.

2.5.4. Polyethylenglycol-Fällung

Die Proteinpräzipitation mit Polyethylenglycol (PEG) wurde nach Ingham (1984) durchgeführt. PEG 8000 (Sigma) wurde als 28%ige Vorratslösung (w/v) in H₂O_{bidest} hergestellt. Die einzelnen Fraktionen des Eluats der PEI-Chromatographie wurden mit 10 ml dieser Vorratslösung versetzt und über Nacht über-Kopf-rotierend vorsichtig vermischt. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und 20 min bei 16 000 g_{av} zentrifugiert (Rotor: JS 13, Beckman Kälzentrifuge). Der Niederschlag wurde einmal mit einer 14%igen PEG-Lösung gewaschen und in 10 ml eines Triton X-100 enthaltenden Trispuffers resuspendiert (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1% Triton X-100).

2.5.5. Ecteola-Cellulose-Chromatographie

Nach der in 2.5.4. beschriebenen PEG-Fällung lagen die Proteine in aggregierter Form vor und waren durch Eppendorf-Zentrifugation pelletierbar. Zur Solubilisierung wurde deshalb durch Einwaage von NaCl eine Salzkonzentration von 300 mM eingestellt. Durch 30-minütiges Rühren mit einem Magnetrührer wurden die Proteine quantitativ gelöst. Die verbleibende Trübung, vermutlich verursacht von Aggregaten aus PEG und PEI, wurde durch

Zentrifugation für 10 min bei 16 000 g_{av} (Rotor JS 13, Beckman Kühlzentrifuge) entfernt und der klare Überstand mit einem Puffer aus 30 mM Tris/ PO_4 , pH 7,0, 1% Triton X-100 1:4 verdünnt. Das Startmaterial besaß nun eine NaCl-Konzentration von 75 mM und ein Volumen von 40 ml. Es wurde auf eine Ecteola-Cellulose-Säule (0,6 x 7,0 cm, V = 2 ml) aufgetragen, die mit 10 mM Tris/ PO_4 , pH 7,0, 75 mM NaCl, 1% Triton X-100 äquilibriert war. (Dieser kommerziell verfügbare Anionenaustauscher wird durch Reaktion einer Mischung aus Epichlorohydrin und Triethanolamin mit alkalischer Cellulose hergestellt (Peterson und Sober, 1961). Die funktionellen Gruppen sind einfach und mehrfach substituierte Triethanolaminreste, die über Glyceryl- und Polyglycerylbrücken an Cellulose gebunden sind.) Die Flußrate betrug 0,17 ml/min. Die Säule wurde gewaschen mit 15 ml des selben Puffers und eluiert mit 20 ml eines linearen Gradienten von 75 bis 300 mM NaCl. 50 Fraktionen á 0,4 ml wurden gesammelt. Je 0,4 ml einer PEG-Lösung (40%-ige Vorratslösung (w/v) in 10 mM Tris/ PO_4 , pH 7,0) wurden zugegeben und alle Fraktionen über Nacht durch über-Kopf-Rotieren schonend inkubiert. Die Proteine wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 20 000 g_{av} quantitativ pelletiert (Rotor JA 20, Beckman Kühlzentrifuge) und die Niederschläge in je 0,1 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, resolubilisiert. Aktive Fraktionen wurden gepoolt, aliquotiert á 50 μ l und bei -20°C aufbewahrt. Der Gesamtpool entsprach der gereinigten Prozessierungs-Peptidase.

Zur Herstellung gereinigten 52 kDa-Polypeptids wurden Fraktionen vereinigt, die bei dieser Chromatographie bei einer Salzkonzentration von etwa 100-120 mM NaCl eluiert wurden. Sie wurden PEG-gefällt und gelagert wie die Prozessierungs-Peptidase. Sie zeigten selbst keine Prozessierungsaktivität und enthielten als einzige Proteinkomponente das 52 kDa-Protein, was durch SDS- Gelelektrophorese und Western Blotting überprüft wurde.

2.6. FPLC-Gelfiltration des Eluats der Zn-Chelat-Chromatographie

Zur nativen Molekulargewichtsbestimmung und zur Trennung der 52 kDa -und 57 kDa-Komponenten wurde eine FPLC-Gelchromatographie mit einer Superose 12 Säule (Pharmacia, Trennbereich 1 500 bis 300 000 Da) durchgeführt. Die Säule wurde mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl (bzw. 100 mM od. 50 mM NaCl) äquilibriert. Als Startmaterial wurde das aktive Eluat der Zn-Chelat-Chromatographie verwendet. Die gereinigte Fraktion hingegen enthielt Triton X-100. Dies veränderte die Chromatographieeigenschaften der Proteine dergestalt, daß ihre Verwendung als Ausgangsmaterial zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts durch Gelfiltration nicht geeignet war. 0,5 ml wurden über eine Auftragsschleife gleichen Volumens injiziert, was

einer Proteinmenge von ca. 0,8 mg entsprach. Wurde die Gelfiltration bei 100 mM oder 50 mM NaCl durchgeführt, so wurden jeweils verdünnte Proben aufgetragen. Die Auftragsmenge bei gleichem Volumen betrug dann 0,4 bzw. 0,2 mg. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min. Nach 12 ml Elution wurden Fraktionen á 250 µl gesammelt und bei -20°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts wurde die Säule mit den folgenden Standardproteinen (Sigma) kalibriert: β -Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Carbonanhydrase (29 kDa), Cytochrom c (12,3 kDa). Zur Bestimmung des Ausschlußvolumens wurde Blue Dextran 2000 (2×10^3 kDa) verwendet. Aus den Verhältnissen der Elutionsvolumina zum Ausschlußvolumen (v_0/v_{void}) und den dekadischen Logarithmen der Molekulargewichte wurde eine Eichgerade erstellt. Die Elutionsvolumina der beiden Proteine (52 kDa- und 57 kDa-Protein) wurden durch SDS-Gelelektrophorese, gefolgt von Immunoblotting und Laserdensitometrie (UltrosanXL, LKB) bestimmt. Das Elutionsprofil der Prozessierungsaktivität wurde mit Hilfe des Standard-Prozessierungstests ermittelt (s. 2.8.). Aus den einzelnen Elutionsvolumina und der Eichgeraden wurden die nativen Molekulargewichte abgeschätzt.

2.7. Proteinsynthese in Lysaten aus Kaninchenretikulozyten

2.7.1. Herstellung von Retikulozytenlysaten

Zur Anreicherung und Gewinnung von Retikulozyten wurden Kaninchen (2,0 - 2,5 kg) nach folgendem Protokoll anämisch gemacht (Gilbert und Anderson, 1971):

Tag I: Injektion von 1 ml Vitaminlösung (bestehend aus: 0,01% Cyanocobalamin, 0,1% Folsäure, in physiologischer Kochsalzlösung) intramuskulär in einen Hinterlauf;

Tag I-V: Injektion von 0,25 ml/kg Kaninchengewicht einer Phenylhydrazinlösung (2,5% (w/v) Phenylhydrazin in physiologischer Kochsalzlösung);

Tag VIII: a) *Blutentnahme durch Herzpunktion:* Zur Verhinderung der Blutgerinnung wurde zunächst 1 ml einer Heparinlösung (5 000 U Heparin/ml physiologischer Kochsalzlösung) in die Ohrvene injiziert. Danach wurde das Kaninchen durch langsames intravenöses Einspritzen von 3 bis 6 ml einer Nembutallösung (54 mg Nembutal/ ml physiologischer Kochsalzlösung) betäubt, der Thorax eröffnet und das Herz mit einer Kanüle punktiert. Das Blut wurde nach Hunt und Jackson (1974) in dickwandigen 30 ml-Corex Zentrifugengläsern aufgefangen, in denen sich eine Vorlage einer eiskalten sterilen Salzlösung (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 7,5 mM MgCl₂, 12,5 U Heparin/ml) befand.

b) *Gewinnung der Retikulozytenfraktion und Lyse derselben:* Die Zellen wurden 10 min bei 2 500 g_{av} (Tragringrotor, Heraeus Christ-Digifuge) pelletiert. Der Überstand wurde mit einer autoklavierten Pasteurpipette und einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, der zelluläre Niederschlag 3 x mit obiger Salzlösung (ohne Heparin) gewaschen. Nach dem zweiten Waschen wurde die den Erythrozyten und Retikulozyten aufliegende graue Schicht an Leukozyten entfernt. Zum Lysieren wurde dem Niederschlag H_2O_{bidest} (etwa das gleiche Volumen) zugegeben. Durch 5-minütiges, kräftiges Rühren mit zwei 5 ml-Pipetten wurden die Zellen lysiert. Zelltrümmer und Membranen wurden durch Zentrifugation (15 min, 20°C, 25 000 g_{av} , Rotor: JA 20, Beckman Kühlzentrifuge) entfernt. Das Lysat wurde in Aliquots á 0,4 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Alle beschriebenen Arbeitsgänge wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.7.2. Isolierung der Poly (A⁺)mRNA aus *Neurospora crassa*

Zur Präparation von *Neurospora* Nukleinsäuren wurden Hyphen aus zwei 8 l-Kulturen nach 14 stündigem Wachstum in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Mörtel mit einem Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Dabei wurde durch wiederholte Zugabe flüssigen Stickstoffs ein Auftauen der Hyphen verhindert. Je 40 g des Pulvers wurden danach mit 120 g sterilem Quarzsand und 160 ml Extraktionsmedium I/II (1:1) bei Raumtemperatur 20 min lang stark geschüttelt.

Extraktionsmedium I (nach Leaver und Ingle, 1971): 10 mM Tris/HCl, pH 8,2, 50 mM KCl, 6% (w/v) p-Aminosalicilat, 2% (w/v) Tri(isopropyl)naphtalinsulfonat;

Extraktionsmedium II: 50% (v/v) Phenolmedium, 49% (v/v) Chloroform, 1% Isoamylalkohol; *Phenolmedium* (nach Kirby, 1968): 500 ml Phenol, gesättigt mit Tris/HCl, pH 8,2, 75 ml frisch destilliertes m-Kresol, 0,5 g 8-Hydroxychinolin.

Organische und wässrige Phase wurden durch Zentrifugation für 15 min bei Raumtemperatur (11 000 g_{av} , Rotor JA 10, Beckman Kühlzentrifuge) voneinander getrennt. Die wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthielt, wurde zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1, w/v) extrahiert und daraus die Nukleinsäuren durch Zugabe des zweifachen Volumens an Ethanol_{abs} über Nacht bei -20°C gefällt. Diese Nukleinsäurefraktion wurde zweimal mit 66% Ethanol gewaschen und in 66% Ethanol bei -20°C aufbewahrt.

Aus der Gesamtnukleinsäurefraktion wurde durch Affinitätschromatographie an Poly(U)-Cellulose die Poly(A⁺) mRNA gewonnen. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen eine Säule aus Poly(U)-Cellulose (2,5 x 5,5 cm) mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA,

100 mM NaCl äquilibriert (=Kopplungspuffer). Die in 66% Ethanol aufbewahrte RNA wurde pelletiert (20 min 11 000 g_{av} , Rotor JA 10, Beckman Kühlzentrifuge), das Pellet etwa 1 h im Exsikkator angetrocknet und in 140 ml autoklaviertem Kopplungspuffer resolubilisiert. Als Maß für die Konzentration der RNA-Lösung wurde deren Absorption bei 260 nm gemessen. Sie lag bei ca. 80 OD/ml. Nach dem Auftrag (Flußrate: 1 ml/min) wurde die Säule mit 200 ml Kopplungspuffer gewaschen und mit 50 ml des Elutionspuffers (10 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA, 90% Formamid) eluiert. Nach Zugabe von Natriumacetat (0,2 M) wurde die Poly(A⁺)mRNA in 66% Ethanol wie bereits beschrieben gef llt und bei -20 C bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Qualität der Präparation wurde durch Erstellen eines Absorptionsspektrums zwischen 230 und 290 nm überprüft. Das Spektrum weist ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 257 nm auf.

Zur *in vitro*-Translation wurde die Poly(A⁺)mRNA durch Zentrifugation pelletiert, wie oben kurz getrocknet und mit sterilem H₂O bidest gelöst. Die Konzentration der RNA wurde bestimmt und eine OD₂₆₀ von 25/ml eingestellt. Aliquots   10 Öl wurden pro Translationsansatz eingesetzt bzw. bei -80 C aufbewahrt.

2.7.3. *In vitro*-Transkription von klonierter cDNA

cDNA-Fragmente mit den kodierenden Sequenzen der ATPase-Untereinheit 2 und 9, des Eisen/Schwefel Proteins des bc₁-Komplexes und Cytochrom c₁ waren in den *E.coli*-Expressionsvektor pGEM3 (Melton et al., 1984) kloniert worden. Zellfreie Transkriptionen wurde mit SP6 RNA-Polymerase durchgeführt.

Lösungen:

10fach konzentrierter Transkriptionspuffer:

- 400 mM HEPES, pH 7,4, 60 mM Mg-Acetat, 20 mM Spermidin, sterilfiltriert;

Vorinkubationspuffer:

- 1fach konzentrierter Transkriptionspuffer, 0,1% BSA, 10 mM DTT, je 0,5 mM der Ribonukleotide ATP, UTP, CTP, GTP;

⁷mGpppG:

- 5 mM (1 OD₂₆₀ in 60 Öl 10 mM HEPES pH 7,9).

Durchführung:

Aus 30 Öl des Vorinkubationspuffers, 1,5 Öl RNasin (33 U/Öl), 2,5 Öl ⁷mGpppG, 5,25 Öl H₂O und 1,5 Öl SP6 RNA-Polymerase (10 U/Öl) wurde ein "Master-Mix" hergestellt. 2,5  g des jeweiligen Plasmids, gelöst in 10 Öl H₂O, wurden zugegeben und bei 40 C 45 min

inkubiert. Im Anschluß an die Transkription wurde mit radioaktivem Retikulozytenlysats ((^{35}S)Methionin-markiert) translatiert.

2.7.4. *In vitro*-Proteinsynthese

Die Synthese von *Neurospora crassa*-Proteinen im zellfreien Retikulozytenlysats wurde nach Pelham und Jackson (1976) durchgeführt. 12,5 μl Hämin (1 mM in 90% Ethylenglykol (v/v), 2 mM Tris/HCl, pH 8,2, 5 mM KCl) war während des Auftauens eines 0,4 ml-Aliquots anwesend. Zum Abbau endogener Nukleinsäuren wurden 5 μl einer 0,1 M CaCl_2 -Lösung und 5 μl *Staphylococcus aureus*-Nuklease dazupipettiert und 15 min bei 20°C (Wasserbad) inkubiert. Durch Zugabe von 25 μl 0,1 M EDTA wurde die Nukleasereaktion beendet und der Ansatz in ein Eisbad gestellt.

Der Translationsansatz wurde nach folgendem Schema hergestellt:

447,5 μl nukleasebehandeltes Lysat
 + 345 μl steriles H_2O _{bidest}
 10 μl Kreatinkinase (5 mg/ml in 50% Glycerin)
 40 μl Aminosäure-Mix (0,5-3 mM jeder L-Aminosäure mit Ausnahme von Methionin bei Markierung mit (^{35}S)Methionin, nach Pelham und Jackson, 1976)
 40 μl KCl/MgCl₂ (2 M/10 mM)
 40 μl Kreatinphosphat (0,2 M)
 0,5 mCi (^{35}S)Methionin
 10 μl Poly(A⁺)mRNA (25 OD/ml)

Nach Inkubation für 90 min bei 30°C wurde die Translation durch rasches Abkühlen des Ansatzes auf 0°C beendet und die Ribosomen durch Ultrazentrifugation bei 166 000 g_{av} (Rotor: Ti 50, Beckman L8-M Ultrazentrifuge, 30 min) entfernt. In Abbildung 1 ist der Einbau radioaktiven Methionins in neusynthetisierte Proteine in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer dargestellt.

Sollte das translatierte Lysat für den Prozessierungs-Peptidase-Test verwendet werden, so wurde es anschließend über eine PD 10-Säule (Pharmacia) entsalzt, die mit 30 mM Tris/HCl, pH 8,2, äquilibriert war. Aliquots á 100 μl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt. Volumina bis zu 200 μl wurden mit Säulen aus Sephadex G 25 wie folgt entsalzt: 2 ml G 25, äquilibriert in 30 mM Tris/HCl, pH 8,2, wurden in sterile 2 ml-Spritzen gefüllt, deren untere Enden mit Glaswolle (Herbst) verschlossen waren. Der Puffer wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (Heraeus Digifuge,

Tragringrotor; Beschleunigen bis 2 200 upm, dann sofort abstoppen der Zentrifugation). Nach Auftrag und Einsickern der zu entsalzenden Probe in die oberste Gelschicht wurde die Zentrifugation wie zuvor wiederholt. Im Reaktionsgefäß befand sich das unverdünnte, entsalzte Lysat.

2.7.5. Bestimmung der Menge an Vorstufe der ATPase-Untereinheit 2 im translatierten Retikulozytenlysat

Zur Bestimmung der Menge der ATPase-Untereinheit 2-Vorstufe im translatierten Retikulozytenlysat wurde zunächst die spezifische Radioaktivität des bei der Translation eingesetzten radioaktiven Methionins ermittelt. Die Methioninkonzentration wurde wie folgt

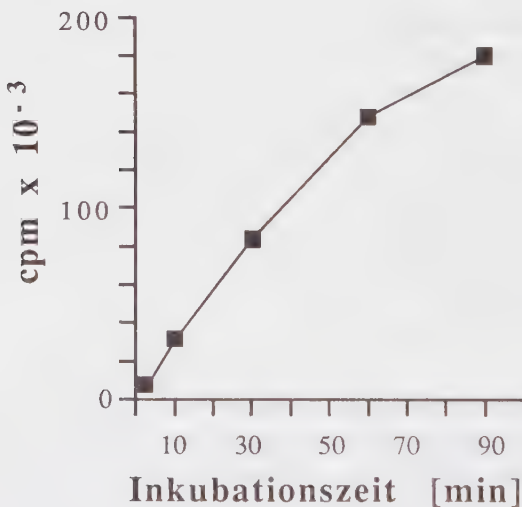


ABBILDUNG 1: *In vitro*-Translation von Vorstufenproteinen: Kinetik des Einbaus von (³⁵S)Methionin
In vitro-Translation von Proteinen wurde in einem nukleasebehandelten Retikulozyten-Translationssystem mit poly(A⁺) mRNA aus *Neurospora crassa* in Anwesenheit von (³⁵S)Methionin wie beschrieben durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und die in Proteine eingebaute Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt (siehe 2.12.3.). Die Radioaktivität der Proteine (dargestellt in cpm) ist in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aufgetragen.

gemessen: Dem Standard-Translationsansatz (s. 2.7.4.) wurden in parallelen Proben steigende Mengen nichtradioaktiven Methionins zugesetzt. Nach 90 Minuten Translation unter Standardbedingungen wurde die jeweilige Radioaktivität der neu synthetisierten Gesamtproteine gemessen (vgl. 2.12.3.). Die graphische Darstellung der einzelnen Werte zeigt die Abnahme der eingebauten Radioaktivität in Abhängigkeit von der Menge zugesetzten Methionins (Abbildung 2). Daraus wurde der "50%-Wert" bestimmt, bei dem die Radioaktivität der Proteine halb so hoch war wie in der Kontrolltranslation (ohne zugesetztes Methionin). Dieser entsprach der Methioninkonzentration des Retikulozytenlysats

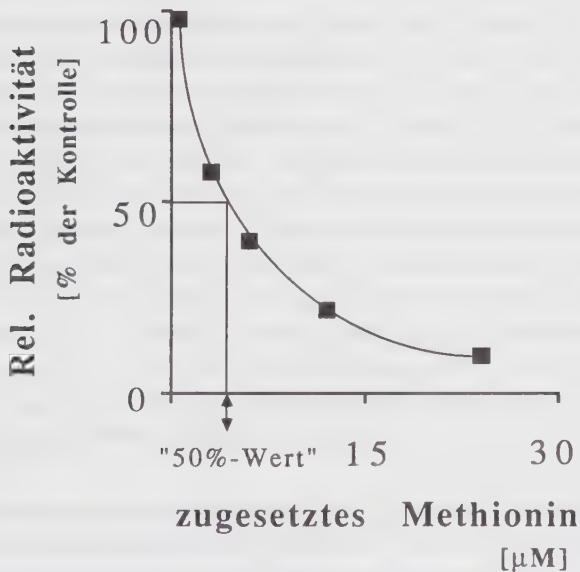


ABBILDUNG 2: Bestimmung der endogenen Methioninkonzentration im Kaninchen-Retikulozytenlysats
In vitro-Translation von *Neurospora*-Proteinen wurde in Anwesenheit von (^{35}S)Methionin durchgeführt. Verschiedene Ansätze enthielten unterschiedliche Mengen zugesetzten unmarkierten Methionins. Die in Proteine eingebaute Radioaktivität wurde gemessen. Der "50%-Wert" gibt diejenige Menge an zugesetztem Methionin an, bei der der Einbau radioaktiven Methionins die Hälfte des Kontrollinbaus (ohne zugesetztem Methionin) betrug. Er ist gleichwertig mit der endogenen Methioninkonzentration in dem bei der Translation verwendeten Retikulozytenlysats.

(und ist gleichzusetzen mit der Summe aus der Menge des endogenen nichtradioaktiven Methionins und des zugesetzten radioaktiven Methionins).

Die ATPase-Untereinheit 2 wurde durch *in vitro*-Translation aus poly (A⁺)mRNA hergestellt. Nach quantitativer Immunfällung, SDS-PAGE und Fluorographie wurde die Gesamtradioaktivität nach Bonner, 1983 (vgl. 2.12.1.) bestimmt. Mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität des Methionins konnte, unter Berücksichtigung der Anzahl von Methioninen der Vorstufe (9), ihre Konzentration berechnet werden. Sie war 57 pmolar. Verschiedene Lysate unterschieden sich nur geringfügig.

2.8. Enzymassay

Die Aktivität der Prozessierungs-Peptidase wurde in standardisierten Prozessierungstests bestimmt. Als Substrat für das Enzym wurden radioaktiv markierte Vorstufenproteine verwendet, die durch *in vitro*-Synthese im Retikulozytenlysat hergestellt wurden. 100 µl eines solchen, entsalzten Lysats (siehe 2.7.4.) wurden mit der zu testenden Enzymfraktion versetzt. Durch Verdünnung mit einer entsprechenden Menge an 30 mM Tris/HCl, pH 8,2, wurde die NaCl-Konzentration des Prozessierungsansatzes unter 30 mM gehalten (vgl. Abbildung 13). Pro 100 µl dieses Ansatzes wurden 10 µl einer wässrigen Tritonlösung (10% Triton X-100), 1 µl 0,1 M PMSF (in Ethanol_{abs}) 2 µl 0,1 M MnCl₂ zugegeben und der Gesamtansatz 60 min bei 25°C im Heizblock (Eppendorf Thermostat 5320) inkubiert. Bei den Tests, bei denen das Enzym über spezifische Antikörper an Protein A-Sepharose immobilisiert war, wurden alle Proben, einschließlich der Kontrollen, bei Raumtemperatur (23-27°C) über Kopf rotierend inkubiert. Die Prozessierungsreaktion wurde durch Zugabe von NaCl und EDTA (die jeweiligen Endkonzentrationen waren 300 mM bzw. 5mM) und Abkühlen auf 0°C beendet.

Die Testansätze wurden 15 min bei 17 000 g_{av} (Rotor: JA 20, Beckman Kühlzentrifuge) zentrifugiert und aus den Überständen Prozessierungsprodukte quantitativ immungefällt (siehe 2.11.3). Die Produkte wurden dann durch SDS-Gelelektrophorese, Fluorographie und Densitometrie analysiert und quantifiziert. Abbildung 3 zeigt die Prozessierung der Vorstufen der ATPase-Untereinheiten 2 und 9 nach Inkubation mit steigenden Mengen des Enzyms. Die Zunahme der Produkte war proportional zur eingesetzten Enzymmenge. Die Untereinheit 9 (= Proteolipid) wurde über eine intermediäre Form zu reifen Form prozessiert.

Die Quantifizierung der Prozessierung der Untereinheit 9 der ATPase wurde alternativ mit einem TLC-Linear Analyzer (LB 2831, Fa.Berthold) durchgeführt. Nach

Prozessierungstest und SDS-PAGE wurde die Radioaktivität der reifen Form des Proteolipids im getrockneten Gel gemessen und mit einem Multichannel Analyzer (Mod. 1024; System BS 27/N) ausgewertet. Die relative Prozessierungsaktivität der Enzymlösung (b), bezogen auf eine Kontrollprozessierung durch die Enzymlösung (a) (100%), berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{rel. Akt. b} = \text{cpm}_b \times V_b \times V_{\text{Test a}} \times 100 / \text{cpm}_a \times V_a \times V_{\text{Test b}} (\%)$$

cpm_a : cpm des reifen Proteolipids der Kontrolle

cpm_b : cpm des reifen Proteolipids der
Testprozessierung

V_a : Gesamtvolumen der Kontrollfraktion (a)

V_b : Gesamtvolumen der Testfraktion (b)

$V_{\text{Test a}}$: Volumen der eingesetzten Kontrollfraktion (a)

$V_{\text{Test b}}$: Volumen der eingesetzten Testfraktion (b)

Eine Einheit der enzymatischen Aktivität wurde definiert als diejenige Enzymmenge, die 1 fmol/min an Vorstufe der ATPase-Untereinheit 2 unter den oben beschriebenen Bedingungen prozessierte. Aus der bekannten Konzentration der Vorstufe der Untereinheit 2 im translatierten Lysat (vgl. 2.7.5.), der im Prozessierungsansatz eingesetzten Lysatmenge und nach Auswertung der Densitometrie läßt sich die umgesetzte Substratmenge quantifizieren.

2.9. Bestimmung der Proteinkonzentration

2.9.1. Bestimmung nach Bradford (1976)

Drei verschiedene Verdünnungen der zu messenden Proben, deren Proteingehalt bei einem Volumen von 50 µl zwischen 2 und 50 µg lag, wurden mit 2,5 ml des 1:5 verdünnten BioRad-Reagens vermischt. Nach 5 min wurde die Extinktion bei 595 nm mit einem Shimadzu-Photometer (UV 240) gemessen. Die Proteinkonzentration errechnete sich aus einer Eichgeraden, die mit 5 verschiedenen Verdünnungen von Rindergammaglobulin (BioRad Proteinstandard II) im Bereich zwischen 1,5 und 60 µg erstellt wurde.

2.9.2. Bestimmung nach Bensadoun und Weinstein (1976)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Modifizierung der Methode nach Lowry et al. (1951). 600 µl einer Proteinlösung, deren Proteingehalt unter 50 µg lag, wurden mit 10 µl einer 1% Na-Deoxycholat-Lösung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl einer 24% TCA-Lösung und 30 min Inkubation im Eisbad wurden die präzipitierten Proteine 20 min bei 10 000 g_{av} abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Der Proteinniederschlag wurde in 450 µl einer frisch hergestellten Reagenzienmischung (25 Teile 0,8 M NaOH, 18 Teile Lösung A, 2 Teile Lösung B) solubilisiert. Danach wurde in kurzen Abständen 2 x 300 µl des 1:2 verdünnten Folin-Ciocalteus Phenolreagens (Merck) zugegeben und gründlich gemischt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 691 nm im Shimadzu-Photometer (UV 240) gemessen. Eine Eichkurve wurde unter den selben Bedingungen mit Proteinmengen zwischen 1,5 und 50 µg erstellt. Als Standardprotein wurde Rinderserumalbumin (Serva, lyophil., rein) verwendet.

Lösung A:

- 7,0 mM Kaliumnatriumtartrat;
- 1,0 M Na_2CO_3 ;
- 0,5 N NaOH;

Lösung B:

- 70 mM Kaliumnatriumtartrat;
- 40 mM $CuSO_4 \times 5 H_2O$;
- 0,1 N NaOH;

2.10. Gelelektrophoretische Trennmethoden

2.10.1. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden gemäß ihres apparenten Molekulargewichts in SDS- Polyacrylamid-Gelen nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Geldimension war 18 x 16 x 0,1 cm. Die Gele bestanden aus Boden-, Trenn- und Sammelgel. In das Sammelgel wurden, wenn nicht anders angegeben, mit einem Kamm Auftragstaschen einpolymerisiert. Folgende drei verschiedenen Geltypen wurden je nach Aufgabenstellung hergestellt:

- I. PROTEOLIPIDGEL (modifiziert nach Fling und Gregerson, 1986): zur Trennung von Vorstufe, Intermediat und reifer Form der ATPase-Untereinheit 9 (= Proteolipid).

Vorratslösungen:

Acrylamid: 48,7% Acrylamid (SERVA, 2x krist., p.A.), 1,3% Bisacrylamid;

"Upper Tris": 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,4% SDS;

"Lower Tris": 3,0 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,4% SDS;

Zusammensetzung:

	<u>Bodengel</u>	<u>Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
Acrylamid	4,0 ml	4,8 ml	0,5 ml
"Lower Tris"	2,5 ml	4,0 ml	/
"Upper Tris"	/	/	1,25 ml
H ₂ O	/	7,2 ml	3,25 ml
AMPDS*	100 µl	100 µl	25 µl
TEMED**	25 µl	4 µl	5 µl

II. 16% TRENNGEL: zur Auftrennung von Proteinfractionen der Reinigung der Prozessierungs-Peptidase (Acrylamidvorratslösung mit 0,2% Bisacrylamid) oder Trennung von Vorstufe und reifer Form der ATPase-Untereinheit 2 (Acrylamidvorratslösung mit 0,8% Bisacrylamid).

Vorratslösungen:

Acrylamid: 30% Acrylamid, 0,2 oder 0,8% Bisacrylamid;

1,875 M Tris/HCl, pH 8,8;

1,0 M Tris/HCl, pH 8,8;

0,6 M Tris/HCl, pH 6,8;

10% SDS;

Zusammensetzung:

	<u>Bodengel</u>	<u>Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
Acrylamid	6,7 ml	8,9 ml	0,83 ml
1,875 M Tris	2,0 ml	/	/
1,0 M Tris	/	6,5 ml	/
0,6 M Tris	/	/	0,5 ml
H ₂ O	1,1 ml	1,2 ml	3,6 ml
SDS	100 µl	167 µl	50 µl
AMPDS*	50 µl	100 µl	25 µl
TEMED**	25 µl	10 µl	5 µl

III. 12,5% TRENNGEL: zur Auftrennung angereicherter Fraktionen des Enzyms.

Vorratslösungen wie beim 16% Trenngel;

Zusammensetzung:

	<u>Bodengel</u>	<u>Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
Acrylamid	6,7 ml	6,7 ml	0,83 ml
1,875 M Tris	2,0 ml	/	/
1,0 M Tris	/	6,5 ml	/
0,6 M Tris	/	/	0,5 ml
H ₂ O	1,1 ml	3,4 ml	3,6 ml
SDS	100 µl	167 µl	50 µl
AMPDS*	50 µl	100 µl	25 µl
TEMED**	25 µl	6 µl	5 µl

* AMPDS (Ammoniumperoxodisulfat) wurde als 10%ige Stammlösung wöchentlich frisch hergestellt.

** TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin.

Die zu trennenden Proben wurden folgendermaßen aufbereitet. Verdünnte Proteinlösungen wurden entweder in Anwesenheit von Na-Deoxycholat TCA-präzipitiert (siehe 2.9.2.) oder lyophilisiert. Nach TCA-Fällung wurden die Proteine einmal mit Aceton (-20°C) gewaschen und abzentrifugiert (Rotor JA 20, 25 000 *g*_{av}, Beckman Kühltrennfuge). Lyophilisierte Proteine wurden ein- bis zweimal (je nach Proteinmenge) in 50% Methanol (p.A.) gewaschen und zentrifugiert w.o.. Danach wurden die Proteine in 30 - 50 µl des Auftragspuffers resuspendiert. Dieser bestand aus 2% SDS, 10% Glycerol, 60 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,01% Bromphenolblau (nichtreduzierender Puffer) und wurde mit 5% β-Mercaptoethanol als reduzierender Auftragspuffer ergänzt. Die Proben wurden 3 min bei 95°C (reduzierender Puffer) bzw. 10 min bei 56°C (nicht reduzierender Puffer) im Eppendorf Thermostat 5320 inkubiert und nach Pelletieren ungelösten Materials durch Zentrifugation aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke von 3 mA über Nacht durchgeführt. Am folgenden Tag wurde sie auf 15 mA erhöht. Beim Eintritt der Bromphenolblau-Front ins Bodengel wurde die Elektrophorese beendet. Sollten die beiden Formen der ATPase-Untereinheit 2 aufgetrennt werden, wurde als Indikatorprotein Cytochrom c aus Rinderherz koelektrophoretisiert. Das wegen seiner Hämgruppe rot gefärbte Protein läßt sich während seiner Wanderung bei der Elektrophorese im Gel beobachten. Zur Erzielung einer optimalen Trennung von Vorstufe und reifer Form

(apparente Molekularmasse 56 kDa bzw. 54 kDa) wurde die Elektrophorese erst kurz nach Verlassen des Bodengels von Cytochrom c (apparente Molmasse: 12 kDa) beendet.

2.10.2. 2-Dimensionale Gelelektrophorese

Die Proteine wurden zweidimensional nach O'Farrell et al.(1977) aufgetrennt. Dabei erfolgte in der 1. Dimension eine isoelektrische Fokussierung, die sie nach ihren isoelektrischen Punkten trennt und in der 2. Dimension eine herkömmliche SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970).

Isoelektrische Fokussierung: In silikonisierten Glasröhrchen (0,4 x 14 cm) wurde ein Gel folgender Zusammensetzung gegossen:

28,38% (w/v) Acrylamid,	
1,62% (w/v) Bisacrylamid	- 1,33 ml
10% Nonidet P-40	- 2,00 ml
H ₂ O	- 2,00 ml
Ampholine, pH 3-9	- 0,50 ml
Harnstoff	- 5,50 g

Die Acrylamid/Harnstofflösung wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und eines 100 ml-Absaugkolbens entgast. Zur Polymerisierung wurden 10 µl frisch angesetztes AMPDS (40%) und 7 µl TEMED zugegeben. Die Lösung wurde rasch blasenfrei in die unten mit Parafilm verschlossenen Röhrchen bis zu einer Höhe von 12 cm eingefüllt und mit 20 µl einer 8 M Harnstofflösung überschichtet. Nach 30 bis 60 min wurde sie entfernt, durch Lysispuffer ersetzt (9,5 M Harnstoff, 2% Nonidet P-40, 2% Ampholine, 5% β-Mercaptoethanol) und mit 10 µl H₂O überschichtet. Nach weiteren 30 min wurde die H₂O-Schicht abgesaugt und die fertigen Gelröhrchen in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Als Anodenpuffer wurde 0,01 M H₃PO₄ (oben), als Kathodenpuffer 0,02 M NaOH (unten) verwendet. Die Proteine, die nach TCA-Fällung in Lysepuffer resolubilisiert waren, wurden in einem Volumen von 20-50 µl mit einer 50 µl- Hamiltonspritze vorsichtig aufgetragen und mit 10 µl 6 M Harnstoff, 0,66% Ampholine überschichtet. Die Fokussierung wurde ca. 5 h bei 300 - 400 V durchgeführt. Als Indikatorprotein wurde in einem der Röhrchen Holocytochrom c aus Pferdeherz fokussiert. Als basisches Protein (pK > 9) wandert es in dieser Zeit bis an den unteren Rand des Gels und zeigt somit das Ende der Fokussierung an. Anschließend wurde das Gel mit schwachem Druck (erzeugt durch eine 5 ml-Spritze und einen Silikonschlauch, der über das obere Ende des Glasröhrchens gestülpt wurde) vorsichtig in eine Vorlage aus 10

ml Auftragspuffer (für SDS-PAGE) übergeführt. Durch leichtes Schwenken (10 min) wurden die Ampholine entfernt. Danach wurde sofort die SDS-PAGE durchgeführt.

SDS-PAGE: Das Gelröhrchen nach der isoelektrischen Fokussierung wurde auf das Sammelgel gelegt, das zu diesem Zweck bis an den oberen Rand der Glasplatten ohne Auftragsaschen gegossen wurde. Das Röhrchen wurde in erwärmter 5%iger Agarlösung luftblasenfrei eingegossen. Danach wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese wie oben beschrieben mit 12,5%igen Trenngelen durchgeführt.

2.10.3. Fixierung und Färbung der Gele mit Coomassie Blue

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in 200 ml einer Lösung aus 35% Isopropanol, 7,5% Essigsäure, 0,05% Coomassie Blue R 250 bei ständigem Schütteln 15 min fixiert und gefärbt. Danach wurden sie in 7,5%iger Essigsäure 5-24 h lang entfärbt, wobei der verbrauchte Entfärber mehrere Male durch frischen ersetzt wurde. Eine 2-3fache Verstärkung der Färbungsintensität der Proteine konnte erzielt werden, wenn der erste Fixierungs/Färbungsschritt nach partieller Entfärbung ein zweites Mal wiederholt wurde. Nach vollständiger Entfärbung des Hintergrunds wurden die Gele für 10 min in 200 ml einer 5%igen wässrigen Glycerinlösung inkubiert und zur Aufbewahrung zwischen zwei Zellophanfolien (Kalle, Einmachzellophan) im Vakuum bei 70°C getrocknet. Gele, die für die Fluorographie bestimmt waren, wurden 10 min in 40% Methanol, 10% Essigsäure und 0,1% Coomassie Blue R 250 fixiert und gefärbt, 2 x 30 min mit 40% Methanol, 10% Essigsäure partiell entfärbt und in 100 ml Amplify (Amersham) (30 min) oder 200 ml Na-Salicylat (1 M Salicylat (60 min) in 1 N NaOH, pH 7,5, 30% Methanol, nach Chamberlain, 1979) inkubiert. Danach wurden sie auf Filterpapier (Whatman) vakuumgetrocknet.

2.11. Immunologische Methoden

2.11.1. Herstellung von Antiseren

2.11.1.1. Aufbereitung der Antigene (nach Knudsen, 1985)

Zwei Kaninchen wurden mit dem 52 kDa-bzw. 57 kDa-Protein immunisiert. Zu diesem Zwecke wurde die gesamte Endfraktion einer Aufarbeitung (ca. 100 µg) im Auftragspuffer solubilisiert (siehe 2.10.1.) und einer SDS-Gelelektrophorese, gefolgt von Western Blotting (siehe 2.11.2.) unterzogen. Die Nitrocellulosemembran wurde mit Ponceau S angefärbt und getrocknet und die beiden Proteine ausgeschnitten. Die an die Nitrocellulose adsorbierten Proteine wurden mit 200 bis 500 µl DMSO solubilisiert. Abschließend wurde die Lösung mit dem jeweils gleichen Volumen Freund'schen Adjuvans vermischt.

2.11.1.2. Immunisierung der Kaninchen

Die Kaninchen (Gewicht zu Beginn der Immunisierung etwa 2 kg) wurden nach folgendem Protokoll immunisiert: (Dabei wurde die Antigenmischung an zwei verschiedenen Stellen in der Nackenregion subcutan injiziert.) Eine Woche nach Entnahme von etwa 5 ml Blut (zur Gewinnung des Präimmunserums) wurde Antigen in vollständigem Freund'schen Adjuvans gespritzt, daraufhin in jeweils zweiwöchigem Abstand Antigen in unvollständigem Freund'schen Adjuvans. Einen Monat nach der zweiten Injektion wurden etwa 10 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und das gewonnene Serum durch Western Blotting auf die Anwesenheit spezifischer Antikörper überprüft. Nach etwa drei Monaten ließ sich der Titer der spezifischen Antikörper nicht weiter steigern und die Kaninchen wurden nach Betäubung mit Nembutal (vgl. 2.7.1.) herzkpunktiert.

2.11.1.3. Gewinnung und Aufbereitung der Seren

Bei der Entnahme wurde das Blut in 15 ml Corex-Glaszentrifugenröhrchen aufgefangen und 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur zur vollständigen Gerinnung stehengelassen. Der Blutkuchen wurde durch Zentrifugation (Rotor JA 20, 10 min, 1500 g_{av}, Beckman Kühlzentrifuge) entfernt. Der Überstand wurde in Polyethylen-Zentrifugenröhrchen transferiert. Durch eine zweite Zentrifugation (Rotor: JA 20, 5 min 20 000 upm, Beckman Kühlzentrifuge) wurden Zelltrümmer entfernt. Der resultierende Überstand wurde 45 min bei 56°C zur Zerstörung von Komplementproteasen inkubiert. Das so gewonnene Serum wurde portioniert (à 300 µl) und bei -20°C aufbewahrt.

2.11.1.4. Herstellung von Gammaglobulinen und Immunglobulinen G

Für einige der Experimente war es nötig, die Gammaglobuline des Serums anzureichern. Zu diesem Zweck wurde eine Ammoniumsulfatfällung (Deutsch, 1967) und eine Anionen-Austauschchromatographie (Fahey, 1967) durchgeführt.

2.11.1.4.1. Ammoniumsulfatfällung des Serums

Das Serum wurde in verschraubbaren Zentrifugenröhrchen tropfenweise mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Sättigung von 35% versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei 40°C über-Kopf-rotiert. Die ausgesalzenen Globuline wurden durch Zentrifugation (Rotor JA 20, 10 min, 6 000 g_{av}, Beckman Kühlzentrifuge) pelletiert. Der Niederschlag wurde einmal mit 40% gesättigter Ammoniumsulfatlösung gewaschen und im halben Ausgangsvolumen in 15 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ x H₂O, pH 7,5, resolubilisiert. In

gequollenen Dialyseschläuchen wurden die zweifach konzentrierten Gammaglobuline gegen diesen Puffer über Nacht dialysiert.

2.11.1.4.2. Anionen-Austauschchromatographie

DEAE-Cellulose (DE 52, Whatman, 0,9 x 7 cm) wurde mit dem Dialysepuffer äquilibriert. Das Dialysat der Ammoniumsulfatfällung wurde mit einer Flußrate von 0,25 ml/h aufgetragen. Die Säule wurde mit 20 ml des Äquilibrierungspuffers gewaschen und gebundene Proteine in einer Stufe mit 1 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ x H₂O, pH 7,5, eluiert. Die Immunglobuline befanden sich im wesentlichen in der Durchlaufsfraction. Das Eluat enthielt neben anderen Proteinen Serumalbumin angereichert (der weitaus größere Anteil des Albumins war jedoch bereits durch die Ammoniumsulfatfällung entfernt worden!).

2.11.2. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blotting, Burnette, 1981) mit anschließender Immunodekoration

Proteine wurden wie in 2.10.1. beschrieben durch SDS-PAGE aufgetrennt. In einem Bad aus Elektrodenpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% Methanol (v/v)) wurde ein "Sandwich" in folgender Reihenfolge luftblasenfrei gebildet: Kathodenplatte; Scotch-Brite; 2 x Whatman-Filter, 3 mm dick; 1 x Whatman-Filter, 1 mm dick; Polyacrylamidgel; Nitrocellulosemembran; 1 x Whatman-Filter, 1mm dick; 2 x Whatman-Filter, 3 mm dick; Scotch-Brite; Anodenplatte. Der assemblierte "Sandwich" wurde in einem "Blotting-Tank" (9x18x20 cm) installiert und der Elektrottransfer der Proteine etwa 20 h bei 8 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt.

2.11.2.1. Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Peroxidasereaktion

Lösungen:

- 5% Magermilchpulver (Nestle) in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,9% NaCl (= MM/TBS);
- Antiserum-MM/TBS: 250-500 µl Antiserum pro 50 ml MM/TBS;
- Goat-Anti-Rabbit-IgG-Peroxidase-MM/TBS: 50 µl Peroxidase, kovalent gekoppelt an anti-Kaninchen Immunglobulinen pro 50 ml MM/TBS;
- Triton/TBS: 0,1% Triton X-100 in TBS;
- 50 mM Tris/HCl, pH 7,5;
- 30% H₂O₂;

Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose 30 min bei 40°C in 50 ml 5% MM/TBS (=Tris buffered saline) geschüttelt. 5% MM wurde an Stelle der

üblichen 3%igen BSA-Lösung verwendet, weil es unspezifische Bindungsstellen weitaus besser abdeckt und dadurch die Hintergrundmarkierung weniger ausgeprägt ist (Hauri und Bucher, 1986). Die Lösung wurde entfernt und durch Antiserum/Magermilch/TBS ersetzt. Nach 90 min Schütteln bei Raumtemperatur erfolgten drei Waschschrte mit Triton/TBS (jeweils 15 min bei Raumtemperatur) und einer mit TBS. Die Nitrocellulosemembran wurde darauf mit "Anti-Kaninchen-IgGs" beladen (45 min bei Raumtemperatur), an die das Enzym Peroxidase kovalent gekoppelt ist. Die vorher beschriebenen Waschschrte wurden wiederholt. Die Enzymreaktion wurde durchgeführt durch Inkubation in einer frisch hergestellten Lösung aus 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, die pro 50 ml der Lösung 15 mg Diaminobenzidin sowie 18 μ l H₂O₂ enthielt. Nach Beendigung der Peroxidase-katalysierten Farbreaktion wurde die Nitrocellulosemembran unter einer Rotlichtlampe getrocknet.

2.11.2.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen durch (¹⁴C)Protein A-Markierung

Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, Inkubation mit dem spezifischen Antiserum und die ersten drei Waschschrte wurden wie in 2.11.2.1. beschrieben durchgeführt. Anstelle eines zweiten Antiserums wurde (¹⁴C)Protein A (hergestellt durch reduktive Methylierung, nach Dottavio-Martin und Ravel, 1978), gelöst in MM/TBS (10⁶cpm/50 ml) zur Markierung spezifisch gebundener Antikörper verwendet. Nach 60 min Schütteln bei Raumtemperatur wurde die Nitrocellulose dreimal in Triton/TBS gewaschen, getrocknet und durch Autoradiographie analysiert.

2.11.3. Immunfällung

Zur spezifischen Präzipitierung von mitochondrialen Proteinen und *in vitro*-synthetisierten Proteinen des Retikulozytenlysats wurde folgende Methode angewandt:

Protein A-Sepharose (1 mg/10 μ l Serum) wurde in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA 30 min bei Raumtemperatur gequollen. Antiserum oder Immunglobuline wurden zupipettiert und in der Kühlbox auf einem Eppendorfrüttler (Mixer 5432) 30 min inkubiert. Dabei binden die Immunglobuline über ihren F_C-Teil an Protein A-Sepharose. Die Sepharose wurde in der Eppendorftischzentrifuge kurz (1 min) abzentrifugiert und der Niederschlag einmal mit Puffer gewaschen. In den Fällen, in denen aus einem mitochondrialen Tritonextrakt unter Beibehaltung der Prozessierungsaktivität immungefällt werden sollte, wurde statt dieses Puffers 30 mM Tris/HCl, pH 8,2, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100 verwendet.

Auf das Antikörper-Protein A-Sepharose-Pellet wurde die Antigen enthaltende Lösung transferiert. Zur Bindung der Antigene wurden die Ansätze (V= 0,6 ml) 45 - 90 min lang im Eppendormixer in der Kühlbox geschüttelt oder schonender im Kühlraum bei 40°C

über-Kopf-rotierend. Gebundenes Antigen wurde durch eine kurze Eppendorffzentrifugation isoliert, gewaschen (3 x mit Triton X-100 enthaltendem Puffer, 1 x mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) und durch SDS-PAGE und Fluorographie oder Enzymtest analysiert.

2.12. Messung der Radioaktivität von Proteinen

2.12.1. Bestimmung der Radioaktivität einzelner Proteine im SDS-Gel durch Flüssigszintillationszählung

Zur Bestimmung der Radioaktivität von Proteinen wurde die von Bonner (1983) beschriebene Methode verwendet. Zur Quantifizierung der Radioaktivität von einzelnen Proteinen wurde zunächst eine SDS-Gelelektrophorese, gefolgt von einer Fluorographie durchgeführt. Die fraglichen Banden wurden im Gel markiert und ausgeschnitten. Sie wurden über Nacht in einer Lösung aus 95 Teilen 30% H_2O_2 und 5 Teilen $\text{NH}_4\text{OH}_{\text{konz}}$ (Endvolumen = 1 ml) in verschließbaren Plastiksintillationsgefäßen im Wasserbad bei 40°C inkubiert. Nach Zugabe von 9 ml Szintillationsflüssigkeit (ACS II, Amersham, 7 ml) wurde die Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler (Packard-TriCarb460-Szintillationszähler) gemessen. Vom Mittelwert (aus drei Einzelwerten) wurde der Leerwert (Mittelwert aus drei nicht radioaktiven Gelstücken äquivalenter Geometrie) subtrahiert. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität von Mitochondrien wurden 5 µl der Mitochondrienlösung zu einem Leerwertsansatz hinzupipettiert und wie beschrieben weiterbehandelt.

2.12.2. Bestimmung der Einbaurate nach *in vitro*-Translation

Zur Bestimmung der Effizienz der *in vitro*-Translation von *Neurospora crassa* -Proteinen wurden nach 90 min aus dem Translationsansatz 5 µl entnommen, in 30 µl Probenauftragspuffer gelöst und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrollwert diente ein "ohne-RNA-Ansatz", der unter den gleichen Translationsbedingungen parallel, jedoch ohne zugefügte *Neurospora*-mRNA stattfand. Die Gesamtradioaktivität der entsprechenden Spuren auf dem getrockneten Gel wurde mit einem TLC-Linear Analyzer (LB 2831, Fa. Berthold) gemessen. Von beiden Werten wurde ein Leerwert subtrahiert, der einer Gelspur entsprach, auf der kein Protein aufgetragen war. Die Einbaurate war dann das Verhältnis von cpm ("mit-RNA")/cpm ("ohne-RNA"). Je nach Qualität der Lysate lag sie bei Werten zwischen 20 und 50.

2.12.3. Bestimmung der Einbaukinetik durch Flüssigszintillationszählung

Die zu verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro*-Translation entnommenen Aliquots wurden auf Rundfilter (Whatman Glasfilter GF/A, 25 mm Durchmesser) pipettiert, die mit 10% TCA (w/v) in Äther gesättigt waren. Nach dem Antrocknen wurden die Plättchen in 5% TCA gewaschen (3 x je 5 min, der 2. Waschgang bei 90°C, sonst bei Raumtemperatur). Nach Dehydratisieren in Äther/Ethanol (1:1) wurden die Filter mit einem Föhn getrocknet. Nach Zugabe von 0,5 ml 1% (w/v) SDS, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, wurden sie in verschraubbaren Szintillationsbechern (20 ml) 30 min zum Lösen der gefällten Proteine kräftig geschüttelt. 12 ml Szintillatorlösung wurden hinzugefügt, bestehend aus 6 g Permablend III pro 100 ml Toluol und 400 ml 2-Methoxyethanol. Die Radioaktivität wurde in einem Packard-TriCarb460-Szintillationszähler gemessen.

2.12.4. Fluorographie und Autoradiographie

Getrocknete Polyacrylamid-Gele (s. 2.10.3.1.) oder Nitrocellulosemembranen, die radioaktive Proteine enthielten, wurden bei Rotlicht auf einen Röntgenfilm (X-Omat AR 5) aufgelegt und bei -80°C ein bis mehrere Tage in einer lichtundurchlässigen Kasette exponiert. Die Filme wurden danach entwickelt in einem automatischen Entwicklungsapparat (Gevamatic 60). Die Quantifizierung der Proteinbanden wurde durch Densitometrie mit einem UltrosanXL Laserdensitometer (LKB) durchgeführt.

2.13. Radiosequenzierung der prozessierten ATPase-Untereinheit 9

2.13.1. Prozessierung der ATPase-Untereinheit 9

Die Vorstufe der ATPase-Untereinheit 9 wurde, ausgehend von einem cDNA-Klon, durch gekoppelte *in vitro*-Transkription und Translation in Anwesenheit von (³⁵S)Methionin hergestellt. Der postribosomale Überstand wurde über G 25 in einem Puffer aus 30 mM Tris/HCl, pH 8,2 entsalzt und mit 10 Einheiten/ml der gereinigten Prozessierungs-Peptidase unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Prozessierungsprodukt (ausschließlich reife Form der ATPase-Untereinheit 9) durch quantitative Immunfällung präzipitiert und durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

2.13.2. Extraktion der Untereinheit 9-Banden aus dem Gel

Die Banden der reifen Untereinheit 9 wurden mit Hilfe des Autoradiogramms lokalisiert und aus dem Gel ausgeschnitten. Nach Entfernung des Filterpapiers und Quellen in H₂O wurde

das Gel durch ein feinmaschiges Metallnetz gepreßt. Die Untereinheit 9 wurde durch zweimalige Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur in einem Puffer aus 30 mM NaH_2PO_4 von pH 8,2, 1% SDS, 1 mM PMSF, 0,005% BSA extrahiert. Nach Entfernung der Acrylamidfragmente durch Zentrifugation wurde der Überstand lyophilisiert und extrahiert in 1 ml einer Lösung aus je einem Teil Triethylamin, Essigsäure und H_2O , sowie 17 Teilen Aceton. Die durch Zentrifugation pelletierten Proteine (Rotor JA 20, Beckman Kühlzentrifuge, 10 min 24 000 g_{av} , -10°C) wurden mit dem selben Volumen an Aceton bei -100°C gewaschen. Die Proteine wurden nach erneutem Pelletieren getrocknet und dem Festphasen-Edmanabbau unterzogen.

2.13.3. Radiosequenzierung durch Festphasen-Edmanabbau

Die aus dem Gel eluierte reife Form der Untereinheit 9 (ca 40 000 cpm) wurde mit Hilfe des Festphasen-Edman-Verfahrens (Wachter et al., 1973) radiosequenziert. Sie wurde 25 aufeinanderfolgenden Abbauschritten unterzogen.

2.14. Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- (^3H)Leucin (45-70 Ci/mMol), (^{35}S)Methionin (ca. 1 000 Ci/mMol), Scintillationsflüssigkeit ASC II: *Amersham-Buchler*, Braunschweig
- (^{35}S)Sulfat (0,4-1,0 Ci/mMol): *NEN Corp.*, Boston, Mass. USA
- Acrylamid, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie-Blue R 250, TEMED, Nembutal, Harnstoff, SDS, Ethanol, p-Aminosalicylat: *SERVA*, Heidelberg
- Kreatinphosphat, Heparin, Hämin, Ecteola-Cellulose, PEI-Cellulose, PEG 8 000, AMPDS, Mercaptoethanol, PMSF, Ampholine (pH 3-9), Molekulargewichtsstandard zur SDS-PAGE (=SDS 7), Molekulargewichts-Kit zur Gelfiltration (=), Rinderserumalbumin: *Sigma*, München
- Ribonuklease-Inhibitor (RNasin aus menschlicher Plazenta): *Promega Biotec*
- SP6-RNA-Polymerase, *Staphylococcus aureus*-Nuklease: *Boehringer*, Mannheim
- Freunds' Adjuvans: *Behring-Werke*, Marburg
- Proteinreagenz und Proteinstandard zur Bradford-Proteinbestimmung: *BioRad*, München
- DE 52-Cellulose, Glasfilter GF/A: *Whatman*, Maidstone, Kent, England
- Dialyseschläuche Visking 18/32: *Medicell*, London, England
- Cap-Analogon 7mGpppG, Ribonukleotide: *Pharmacia P-L Biochemicals*, Freiburg

- Protein A-Sepharose-CL 4B, Sephadex-G25, PD 10-Säulen, Metall-Chelat-Affinitäts-Sepharose 6B: *Pharmacia*, Freiburg
- Nitrocellulosemembran, *Schleicher und Schüll*, Dassel
- Quarzsand, TCA: *Riedel-de-Haen*, Hannover-Seelze
- Röntgenfilm, Entwickler, Fixierer: *Tetanal-Photowerke*, Hamburg
- alle anderen Chemikalien: Merck, Darmstadt

Geräte folgender Firmen wurden verwendet:

- Leersäulen zur Chromatographie, peristaltische Pumpen, UV-Monitore, Fraktionssammler, Gradientenmischer, Superose 12, FPLC: *Pharmacia*, Freiburg
- Kühlzentrifuge J2-21, Ultrazentrifugen der L8-Serie, verschiedene Rotoren: *Beckman Instr.*, München
- Digifuge: *Heraeus-Christ*, Osterode/H.
- Flüssigszintillationszähler TriCarb460: *Packard Instr. Comp.*, Downes Grove, Illinois, USA
- TLC-Radioaktivitätsscanner: *Berthold*, Wildbad
- Schüttler, Tischzentrifugen, Thermostaten: *Eppendorf*, Hamburg
- Waring-Blender: *Bender und Hohbein*, Zürich/München
- Magnetrührer, Ultra-Turrax: *Ika*, Staufen
- Schüttelwasserbäder: *Braun*, Melsungen
- Laserdensitometer UltrosanXL: *LKB*, München
- Photometer UV-240: *Shimadzu*, Kyoto, Japan
- Fein-Waagen: *Sartorius*, Mainz
- Pipetten: *Abimed*, Düsseldorf

3. ERGEBNISSE

3.1. Reinigung der Prozessierungs-Peptidase

3.1.1 Prozessierungstest

Die Prozessierungs-Peptidase spaltet sehr spezifisch nicht denaturierte mitochondriale Vorstufenproteine. Als Metalloprotease wird sie durch die Zugabe zweiwertiger Metallionen stimuliert. Diese beiden Faktoren waren entscheidend bei der Ausarbeitung eines quantitativen Enzymtests.

Als Substrat wurden mit (^{35}S)Methionin markierte Vorstufenproteine verwendet, die durch *in vitro*-Translation hergestellt wurden. Die Prozessierung der ATPase-Untereinheiten 2 und 9 wurde verfolgt. Die Untereinheit 2 wurde, ausgehend von dem Expressionsvektor pGEM3, der die cDNA für dieses Protein enthielt, durch *in vitro*-Transkription und -Translation hergestellt. Nach Durchführung des Prozessierungstests wurden die Produkte durch SDS-Gelelektrophorese, Fluorographie und Densitometrie analysiert und quantifiziert. Zur Prozessierung der Untereinheit 9 diente das Vorstufenprotein aus *Neurospora* als Substrat, wie es nach *in vitro*-Translation der *Neurospora* Poly(A⁺)mRNS im entsalzten Retikulozytenlysat vorlag. Nach der Prozessierung wurde die Untereinheit 9 aus der Vielfalt der radioaktiven Proteine zunächst durch Immunfällung isoliert, bevor die weitere Analyse wie oben durchgeführt werden konnte.

Die Enzymreaktion wurde in Anwesenheit von 2 mM MnCl_2 bei 25°C für 60 min durchgeführt. Es wurde stets soviel Enzymaktivität eingesetzt, daß die Menge des gebildeten Prozessierungsprodukts proportional abhängig war von der Enzymaktivität. Abbildung 3 zeigt ein entsprechendes Experiment. Die Vorstufen der ATPase-Untereinheiten 2 und 9 wurden dabei mit steigenden Mengen eines mitochondrialen Tritonextrakts inkubiert. Die densitometrische Auswertung (Abbildung 3A,B) der jeweiligen Fluorogramme (Abbildung 3C) ist gezeigt. Im Falle der ATPase-Untereinheit 2 verlief die Bildung der reifen Form parallel zur Abnahme der Vorstufe. Die Bildung der reifen Form war in einem begrenzten Bereich linear abhängig von der Menge des mitochondrialen Extrakts. Im Fall der Untereinheit 9 war die Menge der reifen Form ebenfalls innerhalb eines begrenzten Bereichs linear abhängig vom eingesetzten Extrakt. Bei geringen Enzymmengen trat ein Prozessierungsintermediat auf (Schmidt et al., 1984), das mit steigenden Mengen Enzym wieder abnahm (Abbildung 3C). Dieses Intermediat ist ein Prozessierungsprodukt des Enzyms, das *in vitro* bei nicht quantitativer Prozessierung auftritt. Dieses Produkt konnte

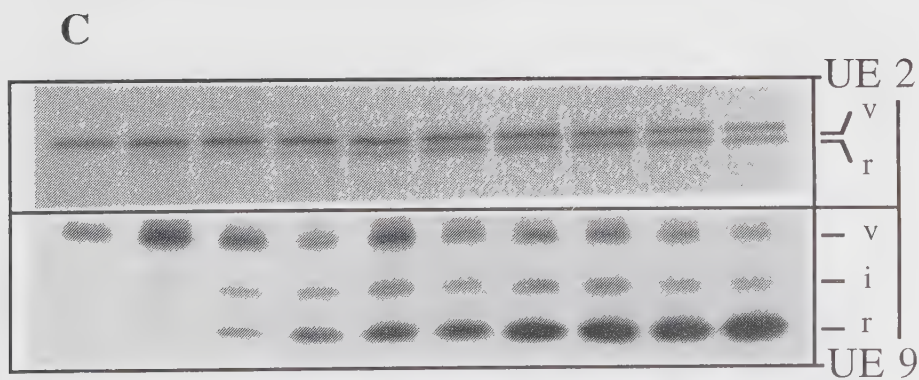
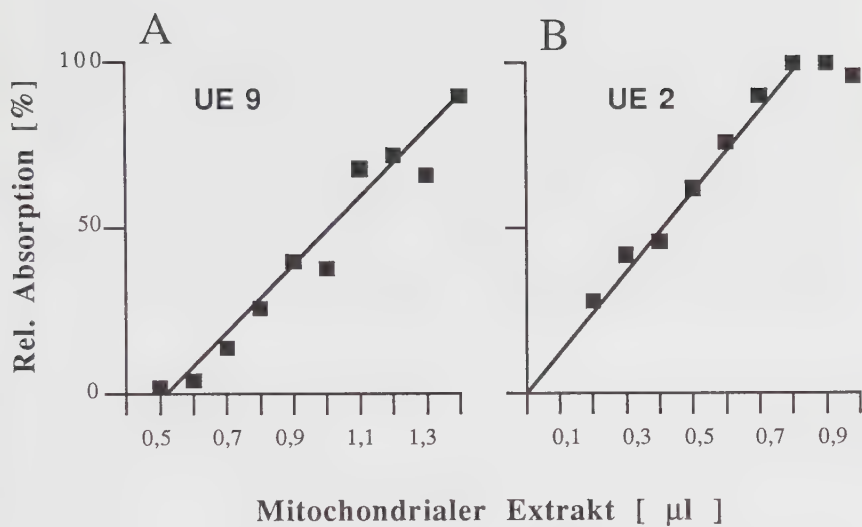


ABBILDUNG 3: *In vitro*-Prozessierung von mitochondrialen Vorstufenproteinen: Prozessierung mit steigenden Mengen des Prozessierungsenzyms

Steigende Mengen eines mitochondrialen Tritonextrakts (Proteinkonzentration: 1 mg/ml) wurden in einem *in vitro*-Prozessierungsansatz analysiert. Substrate der Prozessierungs-Peptidase waren in A: je 100 µl eines entsalzten Retikulozytenlysats, das in Anwesenheit von poly(A⁺)mRNS und (³⁵S)Methionin translatiert worden war; in B: je 2 µl eines Retikulozytenlysats, das als einzige mitochondriale Vorstufe radioaktiv markierte ATPase-Untereinheit 2 enthielt, synthetisiert durch *in vitro*-Transkription/Translation. Das Inkubationsvolumen betrug 200 µl (A) bzw. 25 µl (B). Die Prozessierungsreaktion wurde unter Standardbedingungen durchgeführt und beendet durch Zugabe einer NaCl/EDTA-Lösung in A (Endkonzentrationen: 300 mM bzw. 5 mM), oder durch 1:2-Verdünnung mit zweifach konzentriertem Probenauftragspuffer in B. Die Analyse der Prozessierungsprodukte erfolgte durch Immunfällung (A), SDS-PAGE, Fluorographie und Densitometrie (A und B). Die densitometrische Darstellung zeigt die relativen Absorptionen (bezüglich der jeweiligen Maximalabsorption) der reifen Form von Untereinheit 2 und 9 in Abhängigkeit von der Menge des mitochondrialen Extrakts. C zeigt die A und B zugrundeliegenden Fluorogramme der Prozessierungsaktivitäten mit den ATPase-Untereinheiten 2 und 9 als Substrat.

Abkürzungen: UE 2 = ATPase-Untereinheit 2; UE 9 = ATPase-Untereinheit 9; v = Vorstufe; i = intermediäre Form; r = reife Form.

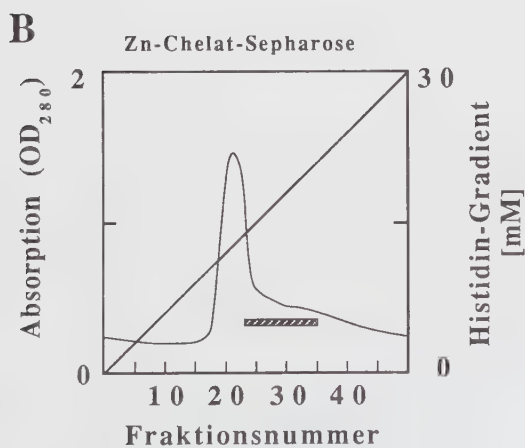
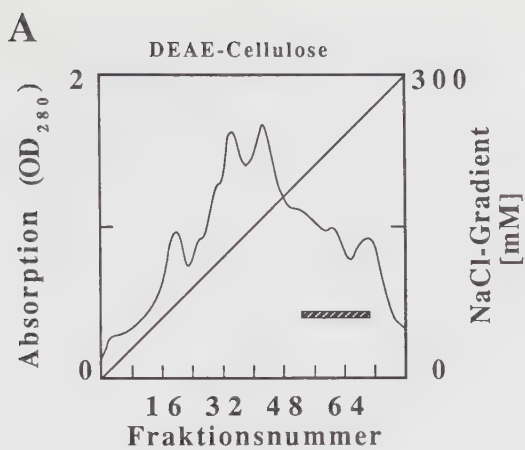
auch *in vivo* demonstriert werden. Es trat auf bei Zellen, die bei niedrigen Temperaturen gewachsen waren und somit in der Aktivität des Enzyms gehemmt waren.

3.1.2. Bestimmung der Enzymaktivität

Voraussetzung für die Isolierung des Enzyms war die Möglichkeit, die Prozessierungsaktivität quantitativ messen zu können. Zu diesem Zweck mußte die Konzentration des Substrats im Test bestimmt werden. Als Konzentration der Vorstufe der Untereinheit 2 im Retikulozytenlysats nach *in vitro*-Translation der Poly(A⁺) wurde 57 pmol/l gemessen (siehe 2.7.5.). Zum Prozessierungstest wurden 50-200 µl des Lysats eingesetzt. Der Anteil an prozessierter Untereinheit 2 wurde durch densitometrische Auswertung der Fluorogramme bestimmt. Als eine Enzymeinheit wurde diejenige Menge an Enzym definiert, die unter Standardbedingungen (25°C; 60 min Inkubationsdauer; linearer Bereich der Prozessierung) 1 fmol Untereinheit 2-Vorstufe pro Minute in die reife Form überführte.

3.1.3. Reinigung des Enzyms

Die Reinigung der Prozessierungs-Peptidase wurde ausgehend von jeweils 200 g Hyphen durchgeführt. Es wurden im allgemeinen Hyphen verwendet, die bei -20°C gelagert waren, da kein Verlust der Enzymaktivität durch diese Art der Aufbewahrung beobachtet wurde. Durch Aufschluß in einem hypotonischen Medium (siehe Material und Methoden) wurde ein Gesamtzellextrakt hergestellt, der von größeren subzellulären Partikeln durch Zentrifugation befreit wurde. Der zelluläre Gesamtextrakt (ca. 1,3 l; ca. 15-20 g Protein) wurde an DEAE-Cellulose chromatographiert. Der überwiegende Teil der Proteine des Ausgangsmaterials



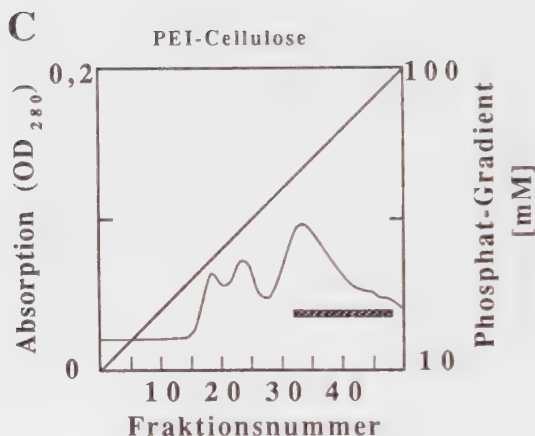


ABBILDUNG 4: Elutionsprofile der verschiedenen Chromatographieschritte

Die einzelnen chromatographischen Schritte zur Reinigung der Prozessierungs-Peptidase wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Der Verlauf der Proteinelution wurde mit einem UV-Monitor (UV-1, Pharmacia) aufgezeichnet. Die Absorption der Proteine wurde bei 280 nm gemessen. Zur Bestimmung der Aktivität einzelner Fraktionen wurde die *in vitro*-Prozessierung der ATPase-Untereinheit 2 gemessen. Fraktionen, die Prozessierungsaktivität enthielten und vereinigt wurden, sind durch den Querbalken gekennzeichnet. Sie wurden dem jeweils folgenden Reinigungsschritt unterzogen. Der jeweils bei der Elution verwendete Gradient ist eingezeichnet (—).

A. 1,4 l des Gesamtzellextrakts wurden an DEAE-Cellulose chromatographiert. Zur Elution wurde ein Gradient von 0 bis 300 mM NaCl verwendet. Das Volumen des vereinigten aktiven Fraktionen betrug 500 ml.

B. Das aktive Eluat nach DEAE-Cellulose-Chromatographie wurde auf eine Zn-Chelat-Affinitätsäule geladen und nach dem Waschen mit einem linearen Gradienten von 0 bis 30 mM Histidin eluiert. Der die angereicherte Prozessierungs-Peptidase enthaltende Pool besaß ein Volumen von 250 ml.

C. Das aktive Eluat der Zn-Chelat-Affinitäts Chromatographie wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie an PEI-Cellulose angereichert. Durch lineare Erhöhung der (PO_4^{3-}) -Konzentration wurde die Prozessierungs-Peptidase eluiert. Das Volumen der vereinten aktiven Fraktionen betrug 150 ml.

band unter den Äquilibrierungsbedingungen nicht an die DEAE-Cellulose oder eluierte bereits bei Salzkonzentrationen unter 200 mM NaCl. Die Enzymaktivität hingegen wurde an das Säulenmaterial gebunden. Nach dem Waschen wurde die Enzymaktivität mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert (Abbildung 4A). Die Prozessierungsaktivität ausgewählter Fraktionen wurde bestimmt. Die Fraktionen, die den Hauptteil der Aktivität enthielten, wurden vereinigt. Sie befanden sich in dem Bereich des linearen NaCl-Gradienten, der 200 bis 280 mM NaCl entsprach. Sie wurden auf eine Metall-Affinitäts-Säule mit immobilisierten Zn-Ionen aufgetragen. Proteine mit exponierten Histidinen können an einer solchen Säule über ihre freien Elektronenpaare binden. Elution wurde mit einem linearen Histidingradienten durchgeführt (Abbildung 4B). Die Aktivität war in Fraktionen der abfallenden Flanke des einzigen Proteingipfels angereichert. Dieser Bereich entsprach einer Histidinkonzentration von 15 bis 25 mM Histidin. Als weiterer Reinigungsschritt erfolgte eine Polyethylenimin-Cellulose-Chromatographie. Polyethylenimin enthält primäre, sekundäre und tertiäre Aminogruppen, die bei der Bindung von Polyanionen wirksam werden. Zur Elution wurde ein Gradient ansteigender Phosphatkonzentration gewählt. Die Enzymaktivität kofraktionierte mit dem dritten von drei charakteristischen Proteingipfeln. Die vereinigten aktiven Fraktionen (Abbildung 4C) wurden durch Präzipitierung mit Polyethylenglykol weiter angereichert. Zusätzlich zu der Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität führte die Fällung der Proteine auf dieser Stufe zu einer Stabilisierung des Enzyms beim Lagern bei -20°C. Der Niederschlag wurde in ca. 1/10 des Ausgangsvolumens in einem Triton X-100 enthaltenden Puffer resuspendiert. Triton X-100 mußte in einer Konzentration von 1% zugegeben werden, um Proteine quantitativ zu suspendieren und im weiteren Verlauf der Reinigung unspezifische, irreversible Adsorption von Proteinen zu verhindern. Durch Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 300 mM NaCl wurden die Proteine quantitativ gelöst. Durch Verdünnung mit Tritonpuffer (siehe Material und Methoden) wurde die Salzkonzentration wieder gesenkt (auf 75 mM NaCl) und eine abschließende Ionenaustauschchromatographie an Ecteola-Cellulose durchgeführt. Dieser Schritt konnte nicht, wie die anderen Chromatographien zuvor, mit einem UV-Monitor verfolgt werden, da Triton X-100 bei 280 nm selbst stark absorbiert und seine Anwesenheit somit die Detektion der Proteine bei dieser Wellenlänge unmöglich machte. Abbildung 5A zeigt die Proteinzusammensetzung nach den einzelnen chromatographischen Schritten nach SDS-Gelelektrophorese und Färbung mit Coomassie Blau. Die gereinigte Fraktion besteht aus zwei Polypeptiden mit apparenten Molekulargewichten von 52 000 bzw. 57 000. Abbildung 5B zeigt das Ergebnis einer zweidimensionalen Gelelektrophorese der gereinigten Peptidase. Die beiden Proteinkomponenten unterscheiden sich demnach nicht nur im apparenten Molekulargewicht sondern besitzen auch unterschiedliche isoelektrische Punkte. Versuche, die beiden Proteine

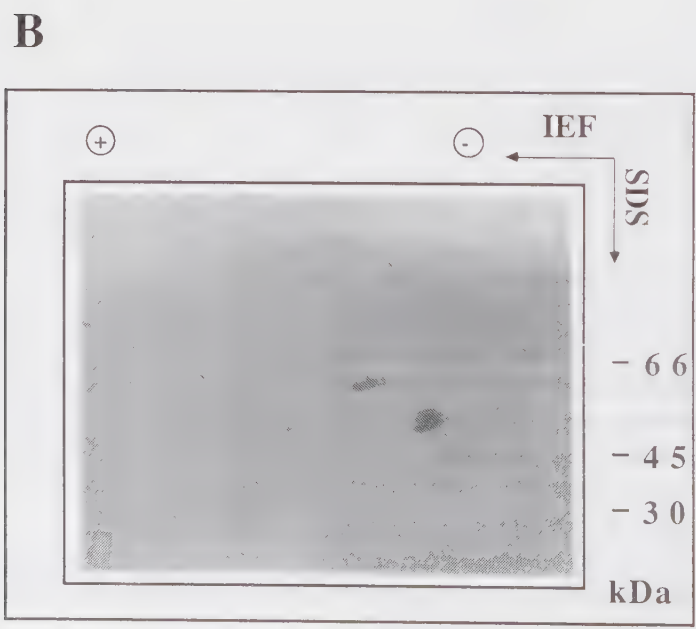
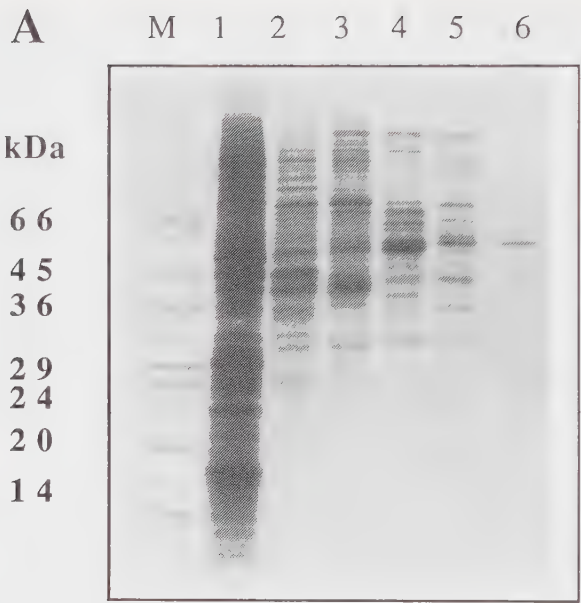


Tabelle I: *Reinigung der mitochondrialen Prozessierungs-Peptidase*

Fraktion	Volumen (ml)	Gesamtprotein (mg)	Gesamt- aktivität (Einheiten)	Spezifische Aktivität (Einh./mg)	Reinigungs- faktor	Ausbeute (%)
Gesamtextrakt	1320	18414	57440	3,1	1	100
DEAE-Cellulose	460	1996	43080	22	7,1	75
Zn-Chelat	230	251	32166	128	41	56
PEI-Cellulose	150	-	16083	-	-	28
PEG-Fällung	10,0	5,13	6893	1344	434	12
Ecteola-Cellulose	1,0	0,11	3274	29764	9601	5,7

ABBILDUNG 5: Reinigung der Prozessierungs-Peptidase: Elektrophoretische Auftrennung von Fraktionen des Reinigungsverfahrens

A. **SDS-PAGE:** Aliquots der einzelnen Fraktionen der Reinigung der Prozessierungs-Peptidase wurden gefriergetrocknet. Die Lyophilisate wurden mit 50% Methanol gewaschen und die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation pelletiert. Sie wurden im Auftragspuffer (siehe Material und Methoden) solubilisiert und 3 min bei 95°C behandelt und in einem 16%igen Polyacrylamidgel in Anwesenheit von 0,1% SDS elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie R 250 gefärbt (siehe 2.10.3.1.). Zur Abschätzung der apparenten Molmasse wurde eine Mischung (10 µg) aus folgenden Standardproteinen (Sigma, SDS 7) mitaufgetragen (*Spur M*): Rinderserumalbumin, 66 kDa; Ovalbumin, 45 kDa; Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, 36 kDa; Carboanhydrase, 29 kDa; Trypsinogen, 24 kDa; Trypsininhibitor, 20,1 kDa; α -Lactalbumin, 14,2 kDa. *Spur 1*: Gesamtzellextrakt (350 µg); *Spur 2*: Eluat der DEAE-Cellulose-Chromatographie (32 µg); *Spur 3*: Eluat der Zn-Chelat-Chromatographie (38 µg); *Spur 4*: Eluat der PEI-Cellulose-Chromatographie (30 µg); *Spur 5*: Niederschlag der PEG-Fällung (25 µg); *Spur 6*: Eluat der Ecteola-Cellulose-Chromatographie (3 µg).

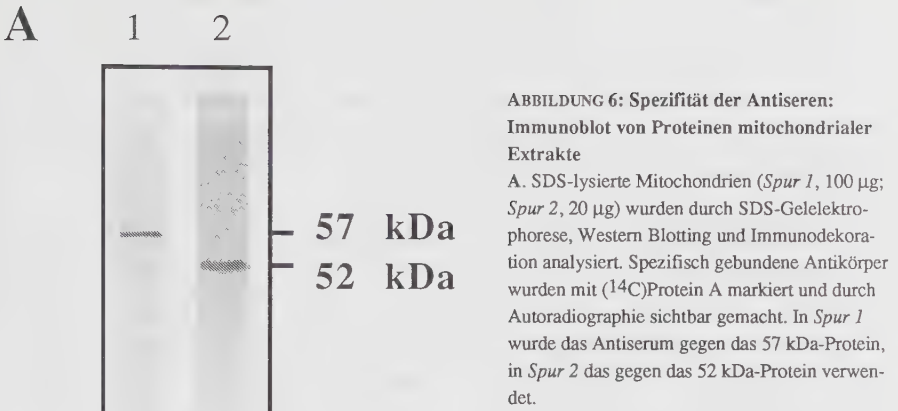
B. **2-D-Elektrophorese:** 3 µg der gereinigten Prozessierungs-Peptidase wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese analysiert. Die Fokussierung wurde in der ersten Dimension mit Ampholinen von pH 3-10 durchgeführt. Die SDS-Gelelektrophorese der zweiten Dimension erfolgte mit einem 12,5%igen Polyacrylamid-Trenngel. Die Positionen der gleichzeitig aufgetrennten Molekulargewichts-Standardproteine (wie in A) sind angegeben.

Tabelle I: Reinigung der mitochondrialen Prozessierungs-Peptidase

Die Prozessierungs-Peptidase aus *Neurospora*-Mitochondrien wurde aus einem zellulären Gesamtextrakt durch die angegebenen Schritte gereinigt (siehe "Material und Methoden"). Eine Enzymeinheit wurde definiert als diejenige Enzymmenge, welche die Prozessierung von einem fmol der Vorstufe pro Minute bei 25°C katalysierte. Für jede der gewonnenen Fraktionen wurde Gesamtvolumen, Proteingehalt und Aktivität gemessen. Daraus wurden spezifische Aktivitäten, Reinigungsfaktoren sowie Ausbeuten berechnet. Der Proteingehalt der Fraktion nach PEI-Cellulose Chromatographie konnte nicht gemessen werden, da PEI mit der Proteinbestimmung interferierte.

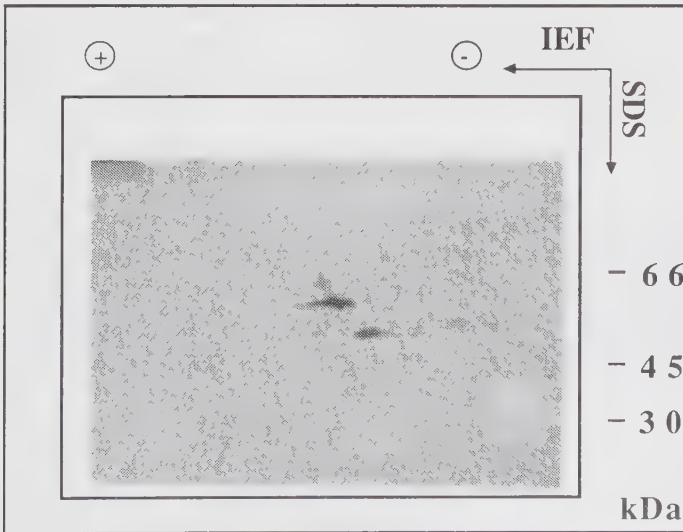
durch andere Methoden wie z.B. hydrophobe Chromatographie, Ionen-Filtrations-Chromatographie oder Chromatofokussierung zu trennen, führten zum Verlust der Prozessierungsaktivität. Bei anderen herkömmlichen Trennmethoden (Ammoniumsulfatfällung, Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation) kofraktionierten die Komponenten.

In Tabelle I sind die spezifischen Enzymaktivitäten, die Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte angegeben. Die Endfraktion war gegenüber dem Zellextrakt etwa 10 000-fach angereichert, die Ausbeute betrug ca. 6%. Zur Bestimmung dieser Werte wurde die Aktivität mit den Vorstufenproteinen sowohl der Untereinheiten 2 als auch 9 der ATP-Synthetase als Substrate getestet.



B. Ein Tritonextrakt aus 100 µg Mitochondrien wurde durch zweidimensionale Gelelektrophorese und Immunoblotting analysiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden durch die Peroxidase-Färbemethode (s. Mat. und Meth.) markiert.

B



3.2. Herstellung spezifischer Antiseren gegen die beiden Komponenten des gereinigten Prozessierungs-Enzyms

Mit Hilfe spezifischer Antikörper sollte überprüft werden, welches der beiden Polypeptide für die proteolytische Abspaltung der Präsequenzen mitochondrialer Vorstufenproteine verantwortlich ist. Das gereinigte Enzym wurde nach SDS-Gelelektrophorese auf Nitrocellulose-Papier elektrotransferiert. Die mit Ponceau S gefärbten Proteinbanden wurden ausgeschnitten, in DMSO gelöst und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (s. 2.11.1.). Durch Immunoblotting wurden spezifische Antikörper gegen die jeweiligen Proteine (52 kDa - und 57 kDa-Protein) nachgewiesen. Elektrobots auf Nitrocellulose wurden mit spezifischen Antiseren gegen das 52 kDa - und 57 kDa-Protein dekoriert. Die gebundenen Antikörper wurden durch Inkubation mit (^{14}C)Protein A und Autoradiographie sichtbar gemacht. Beide Antiseren reagierten selektiv mit ihrem Antigen (Abbildung 6).

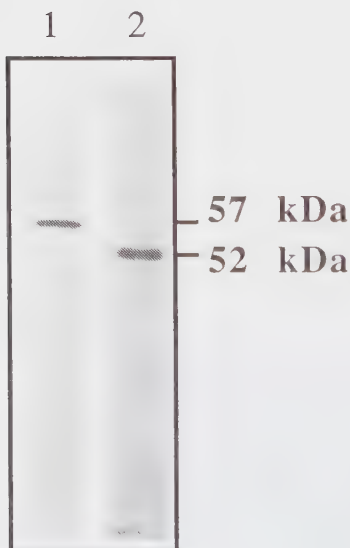


ABBILDUNG 7: Spezifität der Antiseren: Immunfällung aus (^{35}S)-markierten mitochondrialen Tritonextrakten
Tritonextrakte wurden aus Mitochondrien von *Neurospora crassa* hergestellt (s. Mat. und Meth.), die in Gegenwart von (^{35}S)Sulfat gewachsen waren. Die Extrakte wurden inkubiert mit den spezifischen Antiseren, die an Protein A-Sepharose vorgebunden waren. Die Immunkomplexe wurden durch Zentrifugation präzipitiert und durch SDS-Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert. *Spur 1*: Fällung mit anti-57 kDa-Antiserum (Tritonextrakt aus 100 μg Mitochondrien); *Spur 2*: Fällung mit anti-52 kDa-Antiserum (Tritonextrakt aus 20 μg Mitochondrien).

Die Spezifität der Antiseren sollte zusätzlich durch direkte Präzipitation aus Mitochondrien demonstriert werden, deren Proteine mit (^{35}S)Sulfat metabolisch markiert waren (s. 2.3.1.). Abbildung 7 zeigt, daß die Antiseren mit keinem anderen mitochondrialen Protein reagierten. Es wurde jeweils nur ein Antigen erkannt, dessen apparentes Molekulargewicht mit dem in der gereinigten Fraktion übereinstimmte.

3.3. Erfordernis von 57 kDa -und 52 kDa-Komponente bei der enzymatischen Aktivität

3.3.1. FPLC-Gelfiltration

Nach dem oben beschriebenen Reinigungsverfahren enthielt die gereinigte Fraktion zwei Polypeptide mit unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten. Die Frage war zu klären, ob eines davon lediglich als unspezifische Verunreinigung in allen Reinigungsschritten kofraktionierte, oder ob beide Proteine zur enzymatischen Aktivität beitragen und deshalb zwangsläufig gemeinsam angereichert wurden. Eine Möglichkeit hierzu bot ein Verfahren, das zur Trennung der Komponenten führte, wie z.B. Gelfiltration.

Aus diesem Grunde wurde die Enzympräparation nach der Zn-Chelat-Chromatographie durch FPLC-Gelfiltration an Superose 12 aufgetrennt. Der Trennbereich dieses Materials liegt zwischen 1 kDa und 300 kDa. Die Anwesenheit von Triton X-100 in der gereinigten Fraktion veränderte das chromatographische Verhalten der Proteine beträchtlich; aus diesem Grunde waren weiter angereicherte Fraktionen, die Triton enthielten, als Startmaterial ungeeignet. Die nach Gelfiltration erhaltenen Fraktionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotting analysiert. Gleichzeitig wurde in den einzelnen Fraktionen die Prozessierungsaktivität gemessen. Die 52 kDa -und 57 kDa-Komponenten ließen sich teilweise trennen (Abbildung 8A). Ihre Elutionsvolumina wurden mit denen von Standardproteinen in einer Eichgeraden verglichen (s. Mat. und Meth.). Demnach eluierten sie entsprechend ihrem jeweiligen monomeren Molekulargewicht (65 kDa; 48 kDa). Überraschend war, daß die Prozessierungsaktivität mit keiner der beiden Komponenten kofraktionierte. Vielmehr eluierte sie im Bereich der Überlappung (Abbildung 8B, a).

Durch Summierung der Aktivitäten der einzelnen Fraktionen wurde die Gesamtausbeute der Gelfiltration bestimmt. Sie betrug nur ca. 10% verglichen mit dem Startmaterial.

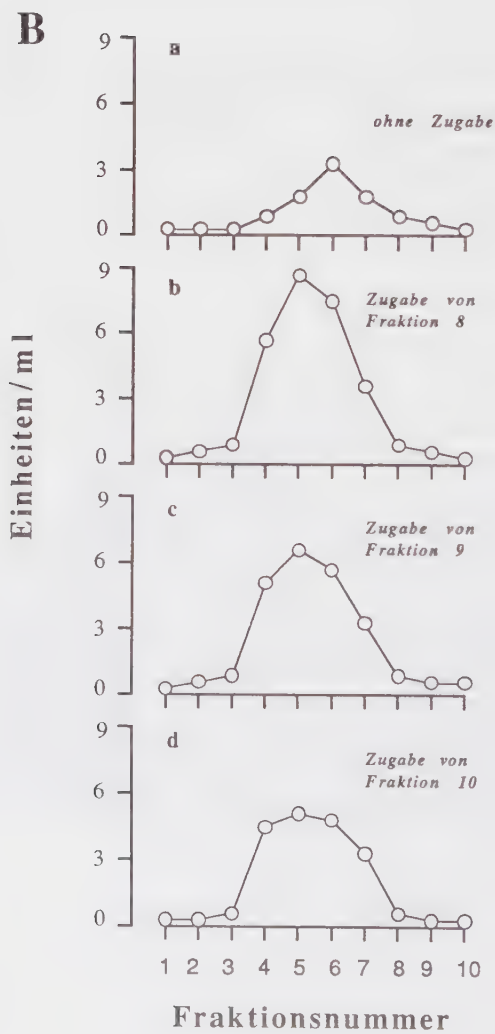
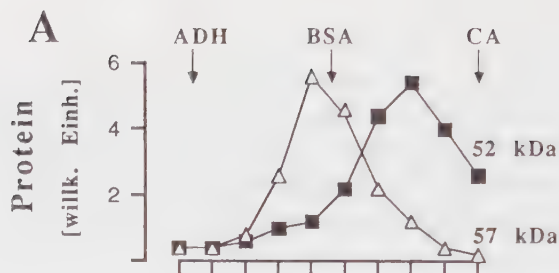


ABBILDUNG 8: Gelfiltration des Eluats der Zn-Chelat-Chromatographie: Elutionsprofile von Prozessierungs-Peptidase, 57 kDa-Protein -und 52 kDa-Protein

800 µg des Eluats der Zn-Chelat-Chromatographie wurden durch FPLC-Gelfiltration aufgetrennt. Es wurde eine Superose 12 Säule verwendet, die mit folgenden Standardproteinen bekannter Molmassen kalibriert wurde: β -Amylase 200 kDa; Alkoholdehydrogenase (ADH) 150 kDa; Rinder Serumalbumin (BSA) 66 kDa; Carboanhydrase (CA) 29 kDa; Cytochrom c 13 kDa. Das Ausschlussvolumen wurde mit Blue Dextran 2000 ($M_r = 2 \times 10^3$ kDa) bestimmt. Fraktionen à 0,25 ml wurden gesammelt.

A. Das Elutionsprofil der Proteine wurde durch Immunoblotting und Laserdensitometrie ermittelt. Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden mit TCA gefällt und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Elektrottransfer auf Nitrocellulose wurden die Proteine durch gleichzeitige Verwendung der Antiseren gegen 57 kDa -und 52 kDa-Proteine immunedekoriert und mit (^{14}C)Protein A radioaktiv markiert. Nach Autoradiographie wurden die Banden auf dem Röntgenfilm durch Laserdensitometrie quantifiziert. Die Absorption ist in willkürlichen Einheiten angegeben. Die Elutionsmaxima von den bei der Kalibrierung verwendeten Standardproteinen sind angezeigt.

B. Das Profil der Prozessierungsaktivität wurde durch den Enzymtest bestimmt. Es wurde die Prozessierung der ATPase Untereinheit 2 untersucht. 10 µl jeder Fraktion wurden im Test eingesetzt (a). In (b) - (d) waren zusätzlich je 10 µl der Fraktion 8 (b), 9 (c) oder 10 (d) während der Testinkubation anwesend. Die Aktivität ist in Enzymeinheiten angegeben.

3.3.2. Wiedervereinigung nach Trennung beider Komponenten durch Gelfiltration

Die teilweise Trennung der 52 kDa -und 57 kDa-Komponenten durch die Superose 12-Gelfiltration führte zu einem Verlust von annähernd 90% der Ausgangsaktivität, obwohl die Proteine selbst fast quantitativ wiedergefunden wurden. Als eine mögliche Ursache dieses Aktivitätsverlusts kommt die Trennung dieser beiden Komponenten in Frage. Durch ein Mischexperiment, bei dem bereits getrennte Fraktionen der Gelfiltration wiedervereinigt wurden, sollte dies überprüft werden. Sollten beide Komponenten für die Prozessierungsaktivität nötig sein, müssten die Aktivitäten der getrennten Fraktionen dadurch stimuliert werden.

800 µg des Eluats der Zn-Chelat-Chromatographie wurden wie in Abschnitt 3.4. beschrieben aufgetrennt (Abbildung 8A). Von jeder Fraktion wurde die Ausgangsaktivität bestimmt. Danach wurde ein Aliquot jeder Fraktion mit einem Aliquot gleichen Volumens jeder anderen Fraktion inkubiert. Auf diese Weise wurden Fraktionen, die eine der beiden Komponenten angereichert hatten, (57 kDa in den Fraktionen 4-6, 52 kDa in den Fraktionen 8-10; Abbildung 8A) mit der jeweils anderen ergänzt. Dann wurden wiederum die Prozessierungsaktivitäten bestimmt. Abbildung 8 zeigt das Aktivitätsprofil des Eluats der Zn-Chelat-Chromatographie (Abbildung 8B, a) sowie die Profile jeweiliger ausgewählter Kombinationen (Abbildung 8B, b-d). Fraktionen mit geringer Ausgangsaktivität, in denen eines der beiden Proteine angereichert war, wurden durch Ergänzung durch das jeweils andere Protein in ihrer Aktivität stimuliert. So steigerten die Fraktionen 8-10 (52 kDa-Protein

angereichert) die vergleichsweise geringen Ausgangsaktivitäten in Fraktion 4-6 (57 kDa-Protein angereichert). Genauso stimulierten die Fraktionen 4-6 die geringen Aktivitäten in Fraktion 8-10. Dabei handelte es sich tatsächlich um eine Stimulierung, denn die Aktivität nach Rekombination lag jeweils über der aus der bloßen Summierung der Einzelaktivitäten zu erwartenden Aktivität. Zusätzlich verschob sich das Elutionsmaximum nach Vereinigung der getrennten Fraktionen in Richtung des 57 kDa-Proteins. Daraus muß man schließen, daß beide Komponenten für die enzymatische Aktivität nötig sind, obwohl sie zumindest unter den Bedingungen der Gelfiltration nicht als Komplex vorlagen.

Die Gelfiltration in Abbildung 8 wurde bei 200 mM NaCl durchgeführt. Es erschien möglich, daß diese Konzentration bereits ausreichte, um einen solchen Komplex zu dissoziieren. Deshalb wurde das Elutionsverhalten der Proteine und der Aktivität bei der FPLC-Gelfiltration mit verringerten NaCl-Konzentrationen überprüft (50 mM, 100 mM). In keinem Fall veränderte sich das Chromatographieverhalten der beiden fraglichen Proteine und der Aktivität (Abbildung 9). Offenbar lag auch bei niedrigeren Ionenstärken kein Komplex vor.

3.4. Präzipitierung der Enzymaktivität mit Immunglobulinen gegen die 57 kDa-Komponente

Aus Mitochondrien von *Neurospora crassa* wurden Tritonextrakte hergestellt und mit steigenden Mengen von spezifischen Immunglobulinen gegen das 52 kDa -oder 57 kDa-Protein und Protein A-Sepharose inkubiert. Nach Pelletierung der Protein A-Sepharose wurde die Prozessierungsaktivität in den Überständen bestimmt. Zusätzlich wurde jeweils der Gehalt an 52 kDa-Komponente bzw. 57 kDa-Komponente in den Überständen durch Immunoblotting ermittelt. Wie Abbildung 10A zeigt, ließ sich die Prozessierungsaktivität mit den anti-57 kDa-Immunglobulinen quantitativ aus dem Überstand entfernen. Parallel dazu präzipitierte das 57 kDa-Protein. Die 57 kDa-Komponente erwies sich somit als limitierender Faktor für die Prozessierungsaktivität.

Die Aktivität verblieb dagegen vollständig im Überstand bei Verwendung von anti-52 kDa-Immunglobulinen (Abbildung 10B) oder von Prä-Immunglobulinen (Kontrolle). Das 52 kDa-Protein ließ sich auch bei Einsatz hoher Immunglobulinmengen nur zu etwa 50% aus dem Überstand entfernen. Dies war auf einen niedrigen Titer des entsprechenden Serums zurückzuführen. Aus technischen Gründen konnte die Menge an 52 kDa-Antiserum nicht so weit erhöht werden, daß sie für eine vollständige Präzipitierung der 52 kDa-Komponente ausgereicht hätte. Die zur Bindung der zusätzlichen Immunglobuline notwendigen höheren

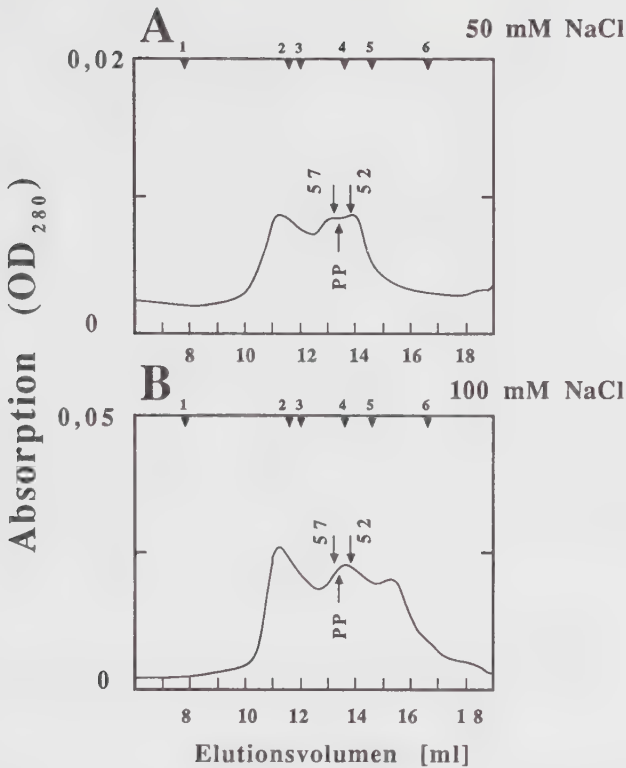


ABBILDUNG 9: Elutionsverhalten von Prozessierungsaktivität, 52 kDa- und 57 kDa-Protein bei FPLC-Gelfiltration mit unterschiedlichen Ionenstärken

FPLC-Gelfiltration wurde durchgeführt wie in Abbildung 8 beschrieben. Die NaCl-Konzentration des Äquilibrungs- und Elutionspuffers war dabei 50 mM (A) und 100 mM (B). Die NaCl-Konzentration des Startmaterials wurde durch Verdünnung mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, auf den jeweiligen Äquilibrungswert eingestellt. Bei einem Auftragsvolumen von 0,5 ml betrug die Proteinmenge 0,2 mg (A) bzw. 0,4 mg (B). Die Elutionsmaxima von 52 kDa- und 57 kDa-Protein und der Prozessierungsaktivität (PP) wurden jeweils wie in Abbildung 8 durch Immunoblotting bzw. Prozessierungstest ermittelt. Das Elutionsprofil der Gesamtproteine wurde mit einem UV-Monitor (UV-M, Pharmacia) bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet. Die Maxima der Elutionspeaks der bei der Kalibrierung verwendeten Molekulargewichts-Standards sind durch Pfeile markiert: Blue Dextran (1), β -Amylase (2), Alkoholdehydrogenase (3), Rinderserumalbumin (4), Carboanhydrase (5), Cytochrom c (6).

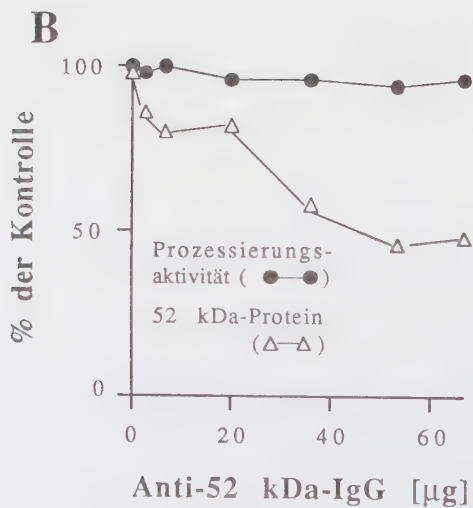
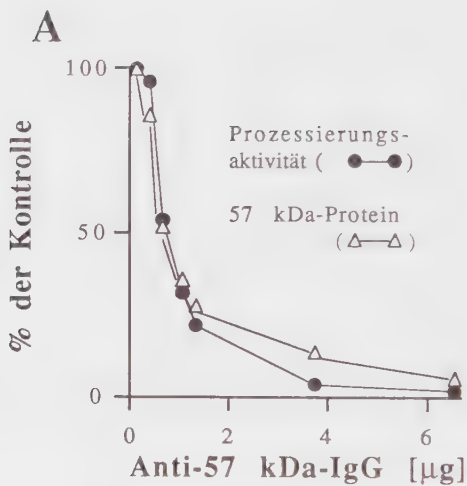


ABBILDUNG 10: Immuntitration von 57 kDa -und 52 kDa-Protein: Auswirkung auf die Prozessierungsaktivität des mitochondrialen Tritonextrakts

Steigende Mengen an Immunglobulinen gegen das 57 kDa-Protein (A) bzw. gegen das 52 kDa-Protein (B) wurden zusammen mit abnehmenden Mengen an Präimmunglobulinen an Protein A-Sepharose vorgebunden. Dadurch enthielten die einzelnen Proben ungefähr die selbe Menge gebundener Globuline, der Kontrollansatz ausschließlich Präimmunglobuline. Aus 20 µg eines mitochondrialen Niederschlags wurden Tritonextrakte (s. Mat. und Meth.) hergestellt und das 57 kDa-Protein bzw. 52 kDa-Protein an die Protein A-Sepharose 90 min lang bei 40°C immunoadsorbiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert und der verbleibende Überstand in zwei Hälften aufgeteilt. Aus einer Hälfte wurde die Prozessierungsaktivität bestimmt. Die andere Hälfte wurde TCA-gefällt und unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einem 16%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. 57 kDa-Protein und 52 kDa-Protein wurden wie in Abbildung 8A mit beiden Antisera markiert und durch Laserdensitometrie quantifiziert. Die Aktivitäten und Proteinmengen sind in % der Kontrolle (Inkubation des Extrakts mit Präimmunglobulinen allein) ausgedrückt.

Mengen an Protein A-Sepharose führten zu einer verstärkten unspezifischen Bindung der Enzymaktivität an die Sepharose. Dies zeigten Kontrollen, bei denen mitochondriale Extrakte mit Protein A-Sepharose allein ohne Zugabe von Immunglobulinen inkubiert wurden. Andererseits war eine Minimalmenge des mitochondrialen Extrakts zur Durchführung des Experiments, einschließlich der Entnahme von Aliquots für Prozessierungstests und Immunoblots nötig.

3.5. Die 57 kDa-Komponente trägt das katalytische Zentrum zur hydrolytischen Spaltung von Peptidbindungen

Wie oben beschrieben, ließ sich die Prozessierungsaktivität durch spezifisch gegen die 57 kDa-Komponente gerichtete Immunglobuline präzipitieren. Dieses Protein war bei der Prozessierung durch mitochondriale Extrakte limitierend. Andererseits waren in den durch Gelfiltration erhaltenen Fraktionen beide Komponenten für die Prozessierungsreaktion notwendig. Um zu entscheiden, welches der beiden Proteine die katalytisch wirksame Komponente war, wurden Experimente durchgeführt, bei denen die beiden Komponenten durch quantitative Immunadsorption vollständig getrennt wurden. Die Prozessierungsaktivitäten der daraus resultierenden Fraktionen wurden gemessen. Nach Wiedervereinigung wurde der Stimulierungseffekt bestimmt.

Mitochondriale Tritonextrakte wurden mit anti-57 kDa-Immunglobulinen inkubiert. Die anschließend gemessene Prozessierungsaktivität entsprach der des unbehandelten Extrakts, d.h. die Immunglobuline waren offenbar weder gegen das katalytische Zentrum des Enzyms gerichtet, noch beeinflussten sie die Konformation des Proteins in einer Weise, die

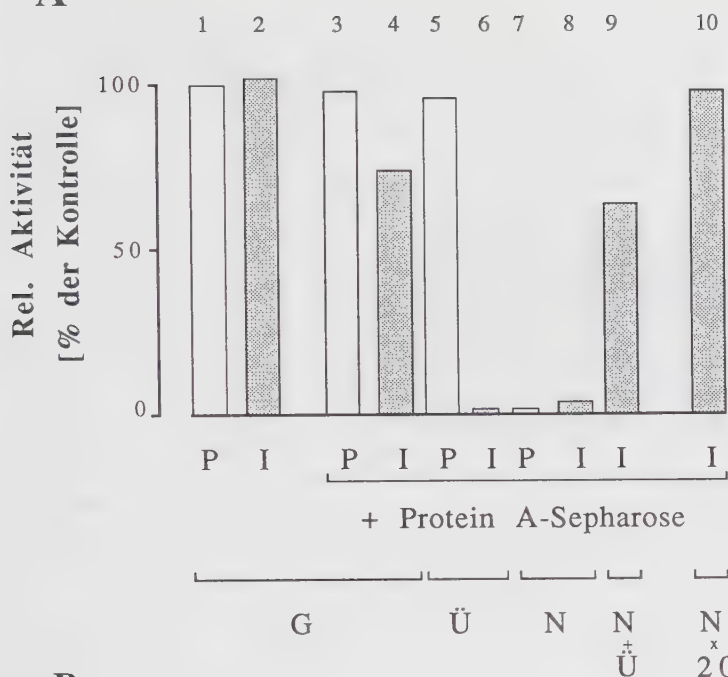
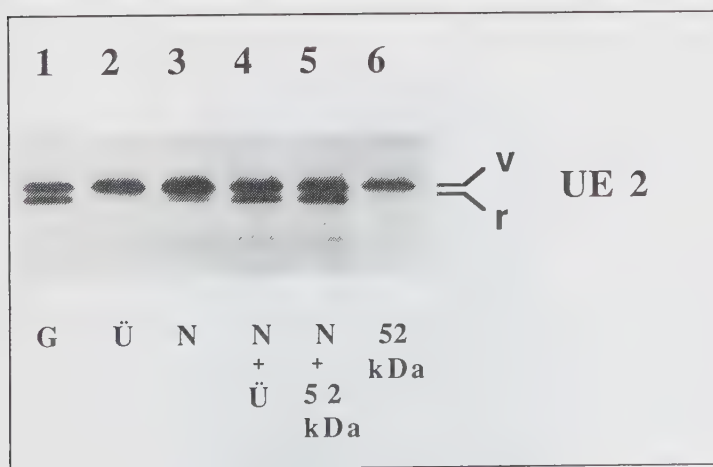
sich auf die Aktivität auswirkte (Abbildung 11A, Säule 2). Nach Zugabe von Protein A-Sepharose war die Aktivität um ca. 30% verringert (Abbildung 11A, Säule 4). Protein A-Sepharose bindet an den F_c -Teil der Immunglobuline, sodaß der Sepharoseanteil des Komplexes die Enzymreaktion behindern konnte (Zugabe von Protein A-Sepharose allein in Abwesenheit der Immunglobuline führte nicht zu einer Verringerung der Prozessierungsaktivität). Nach Zentrifugation der an Sepharose gebundenen Immunkomplexe besaß der Überstand keine Prozessierungsaktivität mehr (Abbildung 11A, Säule 6) (vgl. auch Abbildung 10A), aber auch im Pellet war nur eine vergleichsweise geringe Aktivität meßbar (ca. 5% der Aktivität des Tritonextrakts) (Abbildung 11A, Säule 7). Durch Wiedervereinigung von Niederschlag und Überstand konnte die Aktivität jedoch wieder rekonstituiert werden (Abbildung 11A, Säule 9).

Als Kontrolle wurden die Präzipitierungsexperimente mit Präimmun-Antikörpern durchgeführt. In diesem Fall wurde die Aktivität durch Inkubation mit Protein A-Sepharose nicht verringert. Nach Abtrennung der Protein A-Sepharose blieb die Aktivität quantitativ im Überstand. Wiedervereinigung beider Fraktionen führte nicht zur Stimulierung der Ausgangsaktivität.

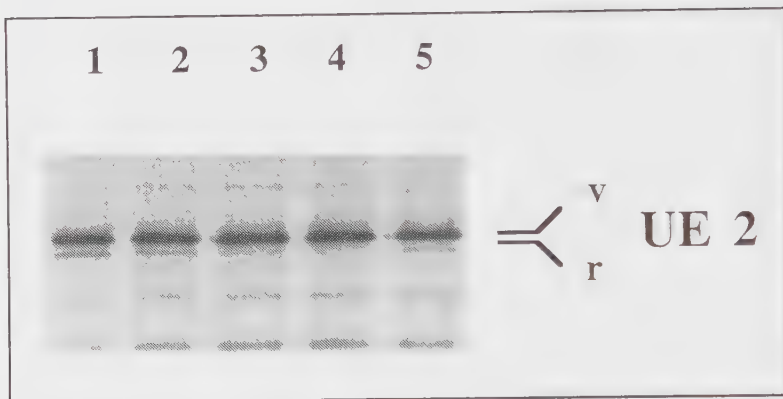
Nach Präzipitierung mit Antikörpern gegen die 57 kDa-Komponente konnte eine geringe Aktivität im Pellet gemessen werden (Abbildung 11A, Säule 8). Um zu überprüfen, ob es sich dabei tatsächlich um spezifische Prozessierung handelte oder ob eine Hintergrundbande auf dem Fluorogramm Prozessierung nur vortäuschte, wurde das 57 kDa-Protein aus dem 20-fachen der Menge Tritonextrakt präzipitiert. Nur im Falle spezifischer Prozessierung war eine Verstärkung des Prozessierungssignals (reife ATPase-Untereinheit 2) zu erwarten. Eine unspezifische Hintergrundbande sollte unbeeinflusst bleiben. Tatsächlich war die vorher geringe Aktivität im 57 kDa-Präzipitat nun ca. 20fach gesteigert.

Daß für die Stimulierung der Prozessierungsaktivität immungefällter 57 kDa-Komponente tatsächlich die im Immunüberstand enthaltene 52 kDa-Komponente verantwortlich war, konnte durch folgende Beobachtung gezeigt werden (Abbildung 11B): Gereinigtes 52 kDa-Protein (siehe Material und Methoden) stimulierte die geringe Enzymaktivität des 57 kDa-Immunpräzipitats beträchtlich.

Diese Experimente waren mit mitochondrialen Tritonextrakten durchgeführt worden, d.h. mit einem sehr heterogenen Proteingemisch. Es sollte überprüft werden, ob der Effekt der Rekonstitution der Enzymaktivität nach vorhergehender Trennung der Komponenten auch mit der gereinigten Enzymfraktion darstellbar war. Anstelle eines mitochondrialen Tritonextrakts wurde deshalb eine entsprechende Menge der gereinigten Enzymfraktion eingesetzt. Auch in diesem Fall wurde die Enzymaktivität durch Zugabe des Antikörpers nicht beeinflusst, aber durch darauffolgende Inkubation mit Protein A-Sepharose leicht reduziert. Trennung der

A**B**

C



D

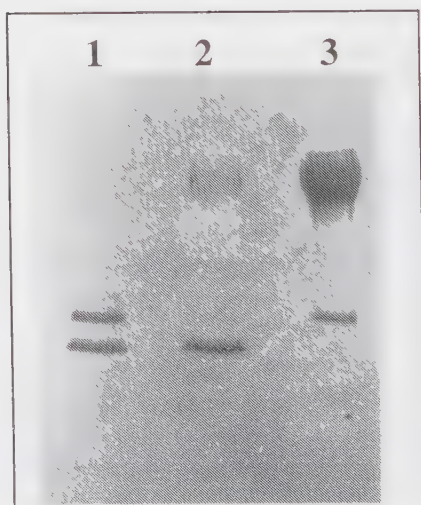


ABBILDUNG 11: Wiederherstellung der vollen enzymatischen Aktivität durch das 52 kDa-Protein nach Isolierung des 57 kDa-Proteins durch Immunoabsorption

A. Mitochondriale Pellets (0,2 mg) wurden in einem Volumen von 0,2 ml gelöst, wie in 2.4. beschrieben. Die Tritonextrakte wurden 45 min lang bei 40°C mit Präimmunglobulinen oder Immunglobulinen gegen das 57 kDa-Protein inkubiert. Danach wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe an Protein A-Sepharose gebunden und die Sepharose durch Zentrifugation pelletiert. Die Überstände wurden in einem Eisbad aufbewahrt, während die Niederschläge 3 x mit 30 mM Tris/HCl pH 8,2, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100 gewaschen und in 0,2 ml des selben Puffers aufgenommen wurden. Aliquots á 10 µl wurden wiedervermischt und weitere 10 min lang inkubiert. Die Prozessierungsaktivitäten aller Fraktionen wurden mit Aliquots bestimmt, die 1 µg der unbehandelten Mitochondrien entsprachen. Sie sind als relative Werte in % der Ausgangsaktivität des mitochondrialen Tritonextrakts ohne Zugabe von Antikörpern ausgedrückt. *Säulen 1-4:* Aktivität der Gesamtfractionen; *Säulen 5,6 und 7,8:* Aktivität in Überstand und Niederschlag; *Säule 9:* Aktivität nach Wiedervereinigung von Überstand und Niederschlag; *Säule 10:* Aktivität eines Niederschlags, der 20 µg Mitochondrien entsprach.

Abkürzungen: P = Inkubation mit Präimmunglobulinen; I = Inkubation mit Immunglobulinen gegen das 57 kDa-Protein. G = Gesamtfraction; Ü = Überstand nach der Immunfällung; N = Niederschlag der Immunfällung.

B. Mitochondriale Extrakte wurden hergestellt und nach Zugabe eines Komplexes, bestehend aus anti-57 kDa-Antikörper und Protein A-Sepharose, wurde das Experiment wie in A durchgeführt. Darüberhinaus wurde die Stimulierung der Prozessierungsaktivität durch gereinigtes 52 kDa-Protein untersucht. Die Aliquots, die zum Prozessierungstest entnommen wurden, entsprachen 1 µg des unbehandelten Mitochondrienextrakts. Die fluorographische Analyse der Prozessierung der Vorstufe der ATPase-Untereinheit 2 mit den Aktivitäten folgender Fraktionen ist dargestellt: *Spur 1:* Extrakt ohne Zugabe des Antikörper-Protein A-Sepharose-Komplexes; *Spur 2:* Überstand (Ü) nach Entfernung des 57 kDa-Proteins durch Immunfällung; *Spur 3:* Niederschlag (N), der das immunoabsorbierte 57 kDa-Protein enthält; *Spur 4:* Niederschlag und Überstand, wiedervereinigt (Ü+N); *Spur 5:* Niederschlag, nach Zugabe von 0,01 µg gereinigtem 52 kDa-Protein; *Spur 6:* 0,01 µg 52 kDa-Protein.

Abkürzungen: v = Vorstufe, r = reife Form der ATPase-Untereinheit 2

C. Das Experiment wurde durchgeführt wie in A. Anstelle eines Mitochondrienextrakts war die gereinigte Prozessierungs-Peptidase (0,3 Einheiten) Quelle der enzymatischen Aktivität (*Spur 1*). Die Prozessierungsaktivität wurde wie in B am Beispiel der Vorstufe der ATPase-Untereinheit 2 untersucht und als Fluorogramm dargestellt. *Spur 2* zeigt die Prozessierungsaktivität des Komplexes aus 57 kDa-Protein, anti-57 kDa-Immunglobulinen und Protein A-Sepharose. *Spur 3* und *4* zeigen die jeweiligen Aktivitäten des Überstands (3) und Niederschlags (4) nach Pelletierung der Protein A-Sepharose und der daran gebundenen Proteine. In *Spur 5* ist die resultierende Aktivität nach Wiedervereinigung von Überstand und Pellet gezeigt.

D. Aus 50 µg Mitochondrien wurde wie in A ein Tritonextrakt hergestellt. Eine Hälfte wurde sofort TCA-gefällt. Zur anderen Hälfte wurde der Komplex aus anti-57 kDa Antikörper und Protein A-Sepharose zugegeben. Das immunoabsorbierte 57 kDa-Protein wurde durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde TCA-gefällt wie die Gesamtmitochondrien, der Niederschlag dreimal in 30 mM Tris/HCl pH 8,2, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100 gewaschen. Die resultierenden Proteine wurden im Probenauftragspuffer aufgenommen (ohne B-Mercaptoethanol) und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine (einschließlich der für die Immunoabsorption verwendeten anti-57 kDa-Antikörper) wurden auf Nitrocellulose elektrottransferiert und mit Antikörpern gegen das 52 kDa- und 57 kDa-Protein beladen. Gebundene Antikörper wurden mit (¹⁴C)Protein A markiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. *Spur 1:* Gesamtmitochondrien; *Spur 2:* Überstand nach Entfernen der Sepharosekügelchen; *Spur 3:* an Protein A-Sepharose immunoabsorbiertes 57 kDa-Protein.

beiden Komponenten durch Zentrifugation führte zu einem ähnlichen Aktivitätsverlust im Immunpräzipitat und im Überstand. Wiedervereinigung beider Komponenten führte zur Rekonstituierung der Enzymaktivität (Abbildung 11C). Um auszuschließen, daß eine kleine Menge kopräzipitierten 52 kDa-Proteins die Ursache der schwachen Aktivität im Pellet war, wurden die Fraktionen des oben beschriebenen Experiments durch Immunoblotting analysiert, wobei die Nitrocellulosemembran gleichzeitig mit den Antiseren gegen 52 kDa - und 57 kDa-Komponente dekoriert wurde (Abbildung 11D). Es wurden Proteinmengen eines mitochondrialen Extrakts analysiert, die dem 50-fachen der in Abbildung 11A getesteten Menge entsprachen. Dabei verblieb das 52 kDa-Protein quantitativ im Überstand (Abbildung 11D, Spur 2), das Immunpräzipitat (Abbildung 11D, Spur 3) enthielt nur die 57 kDa-Komponente. Die bei der gelelektrophoretischen Auftrennung des Präzipitats zusätzlich beobachteten Proteinbanden im Molekularmassenbereich von 180 kDa stellen Immunglobuline dar, die mit dieser Technik ebenfalls markiert werden. Die Sensitivität des Immunoblots war ausreichend, um noch 0,5% des 52 kDa-Proteins in Spur 1 zu erfassen (nicht gezeigt). Dies beweist, daß die 5% Restaktivität im Immunpräzipitat der 57 kDa-Komponente nicht auf eine Verunreinigung durch die 52 kDa-Komponente zurückgingen. Das präzipitierte 57 kDa-Protein enthielt also eine, wenn auch geringe, endogene Aktivität und war somit als die das katalytische Zentrum der Prozessierungsreaktion tragende Komponente charakterisiert. Die 52 kDa-Komponente ist erforderlich zur Erzielung der vollen Prozessierungsaktivität. Sie stimuliert die von der 57 kDa-Komponente durchgeführte Prozessierungsreaktion.

3.6. Quantifizierung der 52 kDa-Komponente und 57 kDa-Komponente in den Mitochondrien

Aus Tabelle I geht hervor, daß die Anreicherung der Prozessierungs-Peptidase in der gereinigten Fraktion etwa 10 000-fach gegenüber dem Zellhomogenat war. Der relative Proteinanteil der Mitochondrien in *Neurospora crassa* beträgt etwa 20% am zellulären Gesamtprotein. Bei einer von Mitochondrien ausgehenden Reinigung würde man deshalb eine 2 000-fache Anreicherung erwarten, d.h. das Prozessierungsenzym sollte etwa 0,05% des mitochondrialen Gesamtproteins ausmachen.

Durch quantitative Immunpräzipitierung aus radioaktiv markierten Mitochondrien (s. Material und Methoden) wurde der Anteil beider Proteine (52 kDa -und 57 kDa-Protein) am mitochondrialen Gesamtprotein ermittelt.

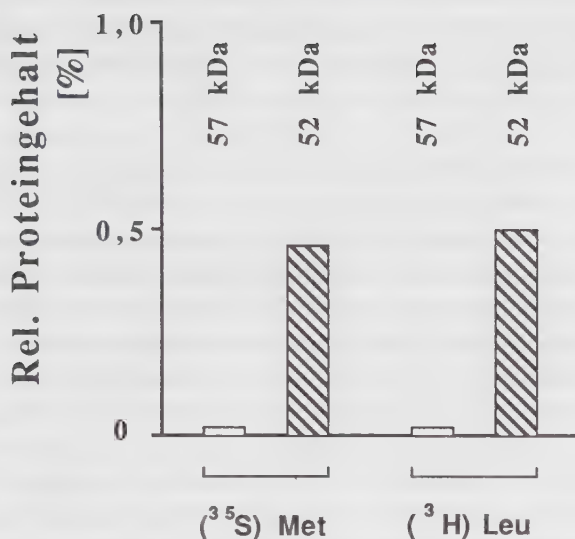


ABBILDUNG 12: Quantifizierung der mitochondrialen Prozessierungs-Peptidase (57 kDa-Komponente) und des Prozessierungs-stimulierenden Proteins (52 kDa-Komponente) in Mitochondrien

(³⁵S)-oder (³H)markierte Mitochondrien wurden in SDS-haltigem Puffer in einer Konzentration von 1 mg/ml lysiert und 3 min bei 95°C inkubiert. Danach wurden 5 µl (52 kDa-Fällung) bzw. 20 µl (57 kDa-Fällung) des SDS-Extrakts auf 600 µl mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 aufgefüllt und 10 min bei 40°C inkubiert. Nach Pelletieren ungelöster Teile durch Zentrifugation wurden die Überstände mit anti-57 kDa -bzw. anti-52 kDa-Antisera quantitativ immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Beide Proteinbanden wurden mit Hilfe des Autoradiogramms auf dem Gel lokalisiert, ausgeschnitten und deren Radioaktivität wie in 2.12.1. beschrieben durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Die Radioaktivität galt als Maß des Proteingehalts. Dieser ist in relativen Werten, bezogen auf die Gesamtradioaktivität der Mitochondrien, dargestellt.

3.6.1. Immunfällung aus Mitochondrien von (^{35}S)Sulfat-markierten Zellen

Für das 57 kDa-Protein war die Menge der Immunglobulinfraktion bekannt, die zur quantitativen Präzipitierung notwendig war (siehe Abbildung 10A). Das 52 kDa-Protein hingegen konnte nur zu etwa 50% präzipitiert werden (siehe Abschnitt 3.4.). Eine quantitative Präzipitierung des 52 kDa-Proteins wurde jedoch erreicht, wenn gegenüber diesen Bedingungen die Menge an Antiserum erhöht und die Menge der Mitochondrien verringert wurde.

In drei parallelen Ansätzen wurde die Immunfällung durchgeführt. Die jeweils immunpräzipitierten Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und ihre Lokalisation im Gel durch Fluorographie bestimmt. Nach Ausschneiden der Banden aus dem getrockneten Gel wurde deren Radioaktivität ermittelt. Der Mittelwert der drei Messungen wurde in Relation gesetzt zur Gesamtradioaktivität der Mitochondrien, die im gleichen Ansatz bestimmt wurde. Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, betrug der Anteil der 52 kDa-Komponente 0,45%, der Anteil der 57 kDa-Komponente jedoch nur 0,03% am mitochondrialen Gesamtprotein.

3.6.2. Immunfällung aus Mitochondrien von (^3H)Leucin-markierten Zellen

Da der Methionin- und Cysteingehalt von Proteinen beträchtlich variieren kann, konnte allein auf der Basis der Markierung der Proteine mit (^{35}S)Sulfat keine verlässliche Quantifizierung der beiden Komponenten durchgeführt werden. Deshalb wurden Mitochondrien immuntitriert, die in Gegenwart von (^3H)Leucin gewachsen waren. Dabei wurden die relativen Mengen von 0,48% (52 kDa-Komponente) und 0,035% (57 kDa-Komponente) bestimmt (Abbildung 12). Diese Werte stimmen sehr gut mit den oben beschriebenen überein.

Die beiden für die Prozessierungsaktivität verantwortlichen Komponenten liegen also in Mitochondrien nicht in gleichen Mengen vor. Das 52 kDa-Protein ist ca. 15-fach häufiger als das 57 kDa-Protein. Dessen gemessener Anteil am mitochondrialen Gesamtprotein von 0,03% stimmt damit auch gut mit dem zu erwartenden Anteil von 0,05% überein. Dies ist gleichzeitig eine Bestätigung dafür, daß das 57 kDa-Protein der limitierende Faktor für die Enzymaktivität ist.

3.7. Charakterisierung der gereinigten Prozessierungs-Peptidase

Die Eigenschaften der bisher in der Literatur beschriebenen mitochondrialen "Matrixproteasen" verschiedener Organismen sind mit ungereinigten Präparationen untersucht worden. Die auf Grund solcher Experimente getroffenen Aussagen sind daher mit

Zweifel behaftet. Mit dem gereinigten Enzym war es nun möglich, verlässliche Aussagen über die Prozessierungs-Peptidase zu gewinnen. Folgende Eigenschaften wurden untersucht:

- 1) *Einfluß von Ionenstärke auf die Enzymaktivität;*
- 2) *Hemmbarkeit des Enzyms durch Chelatoren und Stimulierbarkeit durch zweiwertige Metallionen;*
- 3) *Spezifität des Enzyms hinsichtlich verschiedener Vorstufenproteine;*
- 4) *Spezifität des Enzyms hinsichtlich der Spaltstelle.*

3.7.1. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Ionenstärke

Die im entsalzten Retikulozytenlysat enthaltene Vorstufe der ATPase-Untereinheit 2 wurde in Gegenwart von verschiedenen zugesetzten Konzentrationen NaCl oder KCl mit dem gereinigten Enzym inkubiert. Durch densitometrische Quantifizierung wurde die relative Prozessierungsaktivität bestimmt und in Abhängigkeit von der Salzkonzentration dargestellt (Abbildung 13). Die enzymatische Aktivität nahm mit steigender Salzkonzentration drastisch ab. Die Prozessierungsrate bei einer Salzkonzentration von 60 mM betrug nur noch die Hälfte derjenigen ohne zugesetztem Salz.

3.7.2. Einfluß von zweiwertigen Metallionen auf die Prozessierungsaktivität

Um die Aktivierbarkeit des Prozessierungsenzyms durch zweiwertige Metallionen zu testen, wurde die Prozessierungsaktivität in An- und Abwesenheit von Mn^{++} , bzw. in An- und Abwesenheit von EDTA durchgeführt (Abbildung 14A). Die Peptidase war ohne Zugabe zweiwertiger Metallionen nur schwach aktiv. Diese geringe Aktivität ließ sich durch EDTA inhibieren. Fügte man zum Ausgangsansatz $MnCl_2$ zu (2 mM), so wurde die Aktivität deutlich stimuliert. Komplexierung der zugegebenen Manganionen durch EDTA inhibierte das Enzym wieder vollständig. Dieses Verhalten charakterisiert die Prozessierungs-Peptidase als Metalloprotease.

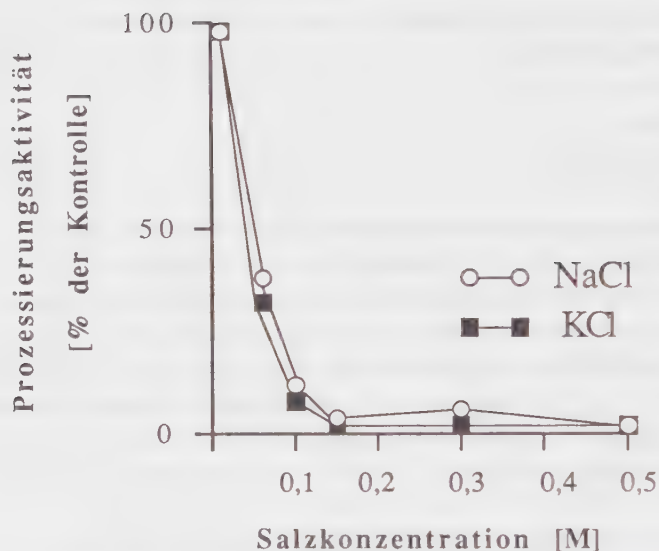
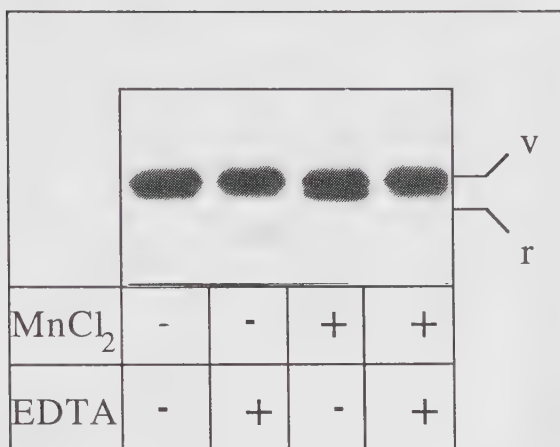


ABBILDUNG 13: Prozessierung der Vorstufe der ATPase-Untereinheit 2 in Abhängigkeit von unterschiedlichen Salzkonzentrationen

Die Prozessierung der Vorstufe der ATPase Untereinheit 2 wurde wie in "Material und Methoden" beschrieben mit folgender Änderung durchgeführt. Durch Zugabe von NaCl oder KCl waren verschiedene Konzentrationen während der Inkubation eingestellt. Die Prozessierungsprodukte wurden nach 60 min immungefällt und durch SDS-Gelelektrophorese, Fluorographie und Densitometrie quantifiziert. Aktivitäten sind in relativen Werten im Verhältnis zur Kontrollaktivität (Prozessierung ohne Salz) ausgedrückt.

A



B

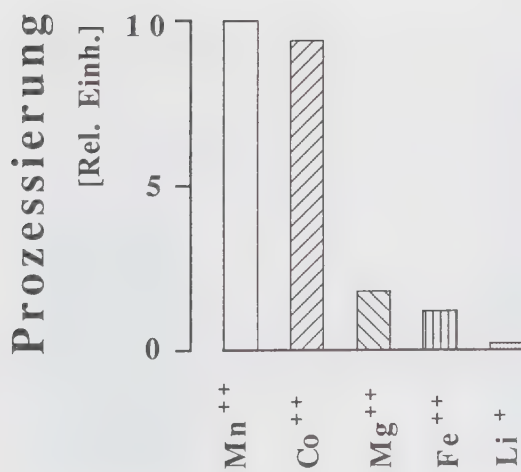


ABBILDUNG 14: Abhängigkeit der Prozessierungs-Peptidase von zweiwertigen Metallionen

A. Der Einfluß von zweiwertigen Metallionen auf die Prozessierung mit dem gereinigten Enzym (jeweils 0,75 Einh./ml) wurde untersucht. Die Prozessierung der Untereinheit 2 wurde ohne Zugabe von MnCl_2 unter Standardbedingungen durchgeführt (*Spur 1*). Daneben enthielten Testansätze gleichen Volumens zusätzlich 5 mM EDTA (*Spur 2, 4*) und/oder 2 mM MnCl_2 (*Spur 3, 4*). Es ist das Fluorogramm der jeweiligen Prozessierungsprodukte dargestellt. *Abkürzungen:* v = Vorstufe, r = reife Form der Untereinheit 2 der ATPase; **B.** Stimulierung der Prozessierung durch verschiedene Metallionen: In An- oder Abwesenheit der angegebenen Metallionen wurde mit 0,75 Einh./ml des gereinigten Enzyms die Prozessierungsreaktion durchgeführt. Die Prozessierungsprodukte wurden jeweils densitometrisch quantifiziert. Ein Maß für die Prozessierung war der Anteil der gebildeten reifen Form der ATPase-Untereinheit 2 am Gesamtsignal (Summe aus Vorstufe und reifer Form). Die Steigerung der Prozessierung in Anwesenheit von 2 mM MnCl_2 , CoCl_2 , MgCl_2 , FeCl_2 , sowie LiCl gegenüber der Kontrollprozessierung (ohne zugesetztes Metallsalz) wurde berechnet. Sie ist in relativen Einheiten angegeben.

In Abbildung 14B ist das Ausmaß der Stimulierung durch verschiedene Metallionen in Form eines Säulendiagramms dargestellt. Die höchste Stimulierung der Kontrollaktivität (keine zugesetzten Metallionen während des Prozessierungstests) wurde durch Zugabe von MnCl_2 erzielt. Annähernd die gleiche Stimulierung konnte durch Zugabe von CoCl_2 erreicht werden. MgCl_2 sowie FeCl_2 wirkten hingegen nur schwach stimulierend. Die umgesetzte Menge der ATPase-Untereinheit 2 war ca. 10-fach geringer als bei der Prozessierung mit den vorher genannten Metallsalzen. Ca^{++} , ein obligater Kofaktor sogenannter Kalzium-aktivierter neutraler Proteinasen (CANP), besaß keinerlei Wirkung auf die Aktivität (nicht gezeigt). Keine Aktivierung zeigte sich, wenn statt zweiwertigen Metallionen einwertige eingesetzt wurden (Li^+).

3.7.3. Prozessierung verschiedener Vorstufenproteine durch die isolierte Prozessierungspeptidase

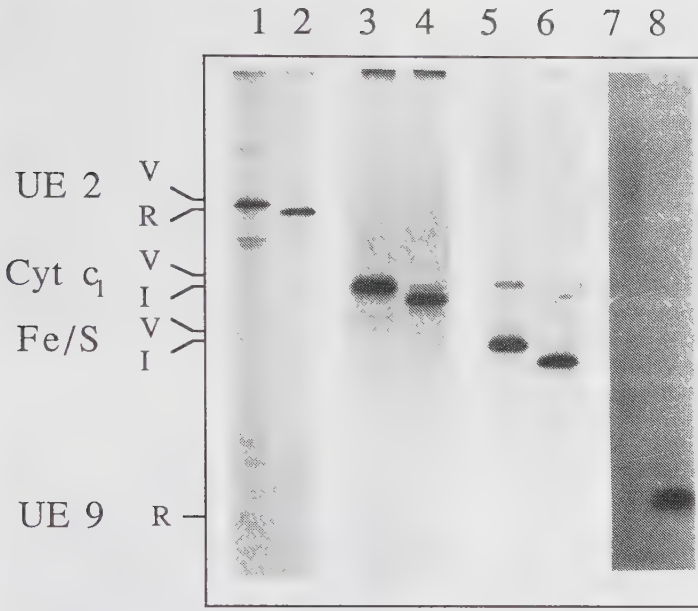
3.7.3.1. PROZESSIERUNG AUTHENTISCHER MITOCHONDRIALER VORSTUFEN

Wie aus Abbildung 15A hervorgeht, wurden die Präsequenzen ("Matrix-targeting"-Sequenzen) aller getesteten Vorstufen (aus *N. crassa*: F_0F_1 -ATPase-Untereinheiten 2 und 9, Cytochrom c1, Rieske Fe/S-Protein) abgespalten.

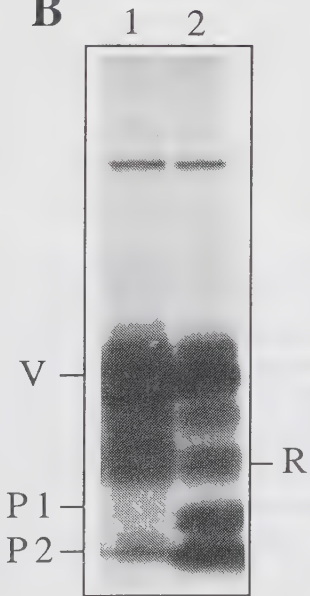
3.7.3.2. PROZESSIERUNG EINER KERNKODIERTEN CHLOROPLASTENVORSTUFE

Es wurde auch getestet, ob das gereinigte mitochondriale Enzym die Vorstufe eines Chloroplastenproteins prozessiert, nämlich der kleinen Untereinheit der Ribulose-

A



B



C

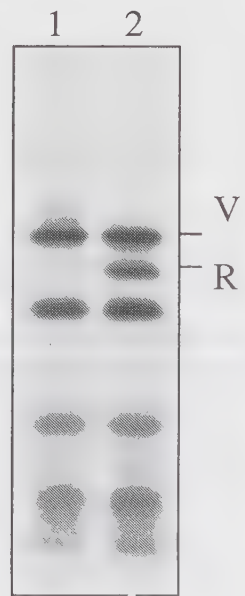


ABBILDUNG 15: Prozessierung verschiedener Vorstufen durch die gereinigte Prozessierungs-Peptidase

A. Durch *in vitro* Transkription-Translation wurden folgende Vorstufenproteine hergestellt und als Substrate für das Enzym eingesetzt: ATPase-Untereinheit 2 = UE 2 (*Spur 1,2*), Cytochrom c1 = Cyt c1 (*Spur 3,4*) "Rieske" Fe/S Protein = FeS (*Spur 5,6*), ATPase-Untereinheit 9 = UE 9 (*Spur 7,8*). Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 10 Einh./ml der Prozessierungs-Peptidase (2,4,6,8) oder ohne Zugabe von Enzym (1,3,5,7) durchgeführt. Durch Inkubation für 3 min bei 95°C in doppelt konzentriertem Probenauftragspuffer wurde die Prozessierung nach 60 min beendet. Die Produkte wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Fluorographie sichtbar gemacht.

B. Das Experiment wurde durchgeführt wie in A. Als Substrat wurde die Vorstufe der kleinen Untereinheit der Ribulosebiphosphatcarboxylase verwendet, ein kernkodiertes Protein des Chloroplastenstromas. Die Inkubation wurde unter Standardbedingungen ohne (*Spur 1*) oder mit Enzym (*Spur 2*) durchgeführt. Die Position von Vorstufe (V), Prozessierungsprodukten (P1, P2), sowie der isolierten reifen Untereinheit (R) sind angegeben.

C. Als Substrat für die Prozessierungs-Peptidase wurde ein Fusionsprotein verwendet, das wie in A durch *in vitro* Transkription/Translation hergestellt worden war. Es ist eine Fusion zwischen der gesamten Vorstufe der ATPase-Untereinheit 9, die mit ihrem C-Terminus an den N-Terminus der Dihydrofolatreduktase anschließt. Die Prozessierungsreaktion wurde unter sonst gleichen Bedingungen ohne (*Spur 1*) oder mit Enzym (*Spur 2*) durchgeführt. V = Vorstufe, R = reife Form

bisphosphatcarboxylase (Abbildung 15B). Diese wird vom Kerngenom kodiert und in Chloroplasten transportiert, wo die Assemblierung zum funktionellen Komplex mit der plastid-kodierten großen Untereinheit erfolgt. Auch hier wurde Spaltung beobachtet. Zusätzlich zu den beiden Proteinbanden niedrigeren Molekulargewichts, die bereits Bestandteil des nicht prozessierten translatierten Lysats waren, traten zwei weitere Spaltprodukte auf. Diese besaßen jedoch jeweils ein deutlich geringeres apparentes Molekulargewicht als das authentische reife Protein. Wenngleich die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase die kompartimentfremde Vorstufe als Substrat erkannte, so war sie offenbar nicht in der Lage, die korrekte Spaltstelle des Chloroplastenproteins zu finden.

3.7.3.3. PROZESSIERUNG EINES FUSIONSPROTEINS

Viele Fragestellungen zur Biogenese mitochondrialer Proteine sind unter Verwendung von Fusionsproteinen bearbeitet worden. Derartige Fusionsproteine, die zum einen aus mitochondrialen Präsequenzen, zum anderen aus cytosolischen Proteinen bestehen (z.B. die Dihydrofolatreduktase der Maus), werden *in vitro* und *in vivo* in Mitochondrien importiert und korrekt prozessiert (Hurt und van Loon, 1986). Es wurde überprüft, ob die gereinigte Prozessierungs-Peptidase in der Lage war, ein solches Fusionsprotein zu spalten. Das untersuchte chimäre Protein bestand aus der Vorstufe der ATPase-Untereinheit 9 und der Dihydrofolatreduktase. Abbildung 15C zeigt, daß dieses Fusionsprotein von dem gereinigten Enzym zu einem Produkt niedrigeren apparenten Molekulargewichts prozessiert wurde, wobei die Molekulargewichtsdifferenz der Größe der entfernten Präsequenz entsprach.

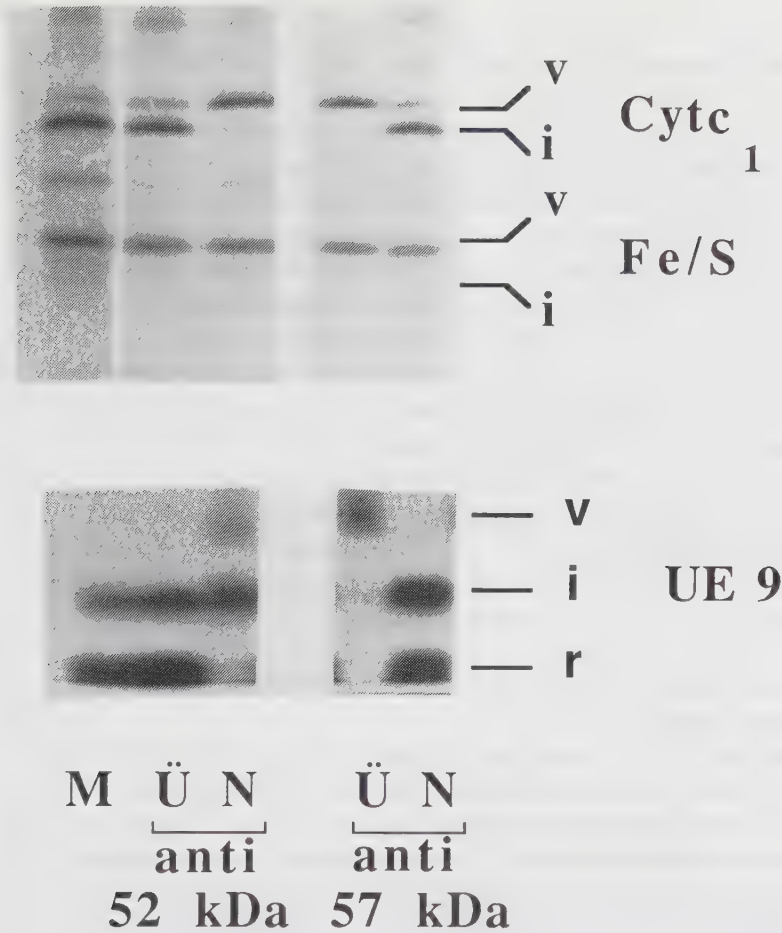


Abbildung 16: Prozessierung verschiedener mitochondrialer Vorstufenproteine durch immunpräzipitierte 57 kDa-Komponente

Aus mitochondrialen Tritonextrakten wurde die Prozessierungs-Peptidase mit spezifischen Antikörpern gegen 52- und 57 kDa-Protein quantitativ immungefällt. Mitochondrialer Extrakt (M), der verbleibende Überstand (Ü) und der immunadsorbierte Niederschlag (N) wurden mit mitochondrialen Vorstufenproteinen (aus poly(A⁺)mRNS-translatierten Retikulozytenlysaten) unter Standardbedingungen dem Prozessierungstest unterzogen. Danach wurden die Prozessierungsprodukte mit spezifischen Antisera gegen die ATPase Untereinheiten 9 (= UE 9), Cytochrom c1 (= Cyt c1) und das "Rieske" Fe/S-Protein (= Fe/S) gesammelt und durch SDS-PAGE- und Fluorographie analysiert. v=Vorstufe; i=intermediäre Form; r=reife Form.

3.7.4. Prozessierung verschiedener Vorstufenproteine durch immunpräzipitiertes 57 kDa-Protein

Zur vollen Aktivität der Prozessierungs-Peptidase wurden zwei Proteinkomponenten benötigt. Wie jedoch oben gezeigt, wird die eigentliche hydrolytische Spaltung der Peptidbindung von der 57 kDa-Komponente ausgeführt, die für sich eine geringe Aktivität besaß. Dies war am Beispiel der ATPase-Untereinheit 2 als Vorstufe beobachtet worden. Für andere Vorstufen konnte daher die Möglichkeit bestehen, daß zur Prozessierung die gleichzeitige Anwesenheit beider Komponenten nötig war. Dies wurde mit den Vorstufenproteinen der ATPase-Untereinheit 9, des Cytochrom c₁ und des "Rieske" Fe/S-Proteins überprüft.

Immunadsorbiertes 57 kDa-Protein wurde mit *in vitro*-translatiertem radioaktivem Retikulozytenlysat in Gegenwart folgender Fraktionen inkubiert: einem mitochondrialen Tritonextrakt, sowie mit dem Überstand und Niederschlag der 57 kDa-Immunfällung. Nach Beendigung der Inkubation wurden die entsprechenden Vorstufenproteine durch Immunpräzipitation abgetrennt und durch SDS-Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert. Aus Abbildung 16 geht hervor, daß alle untersuchten Vorstufenproteine von dem 57 kDa-Protein allein prozessiert wurden. Der Überstand, der nur 52 kDa-Protein enthielt, war nicht aktiv.

3.7.5. Prozessierung der Vorstufe der ATPase-Untereinheit 9: Bestimmung der Schnittstelle durch Radiosequenzierung

Um zu überprüfen, ob das gereinigte Enzym die Prozessierung an der korrekten Position durchführt, wurde ein Prozessierungsprodukt radiosequenziert. Als Substrat wurde die Vorstufe der ATPase-Untereinheit 9 verwendet, die durch *in vitro*-Transkription und Translation der in dem Expressionsvektor pGEM3 vorliegenden cDNA dieses Proteins synthetisiert wurde. Zur radioaktiven Markierung wurde (³⁵S)Methionin eingesetzt. Radioaktives Methionin wurde beim Edmanabbau mit Hilfe des Festphasenverfahrens in den Abbauschritten 9, 14 und 18 freigesetzt (Abbildung 17). Aus dem Vergleich mit der bekannten Aminosäuresequenz der ATPase-Untereinheit 9 (Viebrock et al., 1982) geht hervor, daß tatsächlich die Spaltung an der korrekten Stelle erfolgt war. In den Positionen 9 und 18 der reifen Untereinheit 9 liegen Methionine vor, in Position 14 findet sich Lysin. Da die Koppelung an die Festphase über Lysinreste erfolgt und bei Sequenzierung über Lysine radioaktives Polypeptid freigesetzt werden kann, war an dieser Stelle ein entsprechendes Signal zu erwarten.

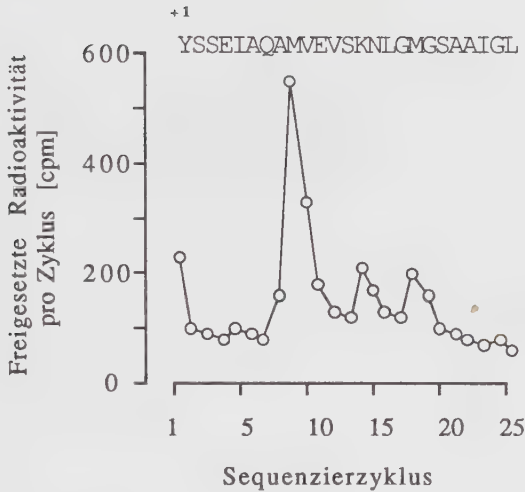
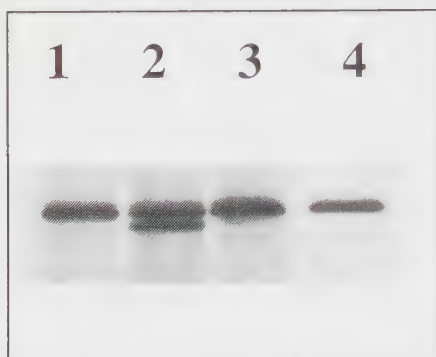


ABBILDUNG 17: Sequenzanalyse der *in vitro* prozessierten Untereinheit 9 der ATPase

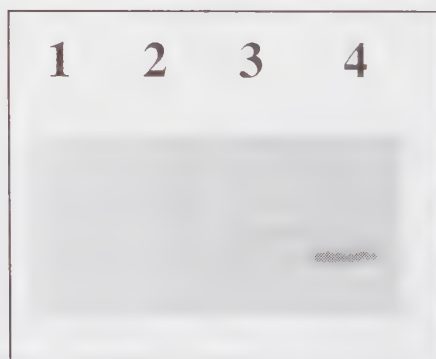
Die Vorstufe der ATPase-Untereinheit 9 wurde durch *in vitro*- Transkription/Translation in Anwesenheit von (^{35}S)Methionin synthetisiert. Das Endvolumen betrug 200 μl . Der postribosomale, entsaltzte Überstand wurde mit 10 Einheiten/ml der gereinigten Prozessierungs-Peptidase unter Standardbedingungen inkubiert. Die Untereinheit 9 wurde immungefällt und einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Radioaktive Banden wurden durch Fluorographie sichtbar gemacht. Die reife Untereinheit 9 wurde aus dem Gel eluiert (ca. 40 000 cpm) und durch Festphasen-Edmanabbau analysiert (Wachter et al., 1973). Die Aminosäuresequenz der Untereinheit 9 aus *Neurospora* ist abgebildet (Viebrock et al., 1982); +1 markiert den Aminoterminus der reifen Form. Radioaktivität wurde bei den Methioninen 9 und 18 und bei Lysin 14 freigesetzt, da die Untereinheit 9 über Lysinreste an die Festphase gekoppelt ist (Schmidt et al., 1984).

A



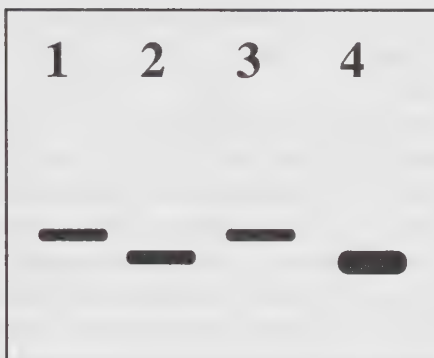
PP	-	+	+
EDTA/NaCl	-	-	+

B



PP	-	+	+
EDTA/NaCl	-	-	+

C



PP	-	+	+
EDTA/NaCl	-	-	+

ABBILDUNG 18: Translation und Prozessierung von Vorstufen der 52 kDa -und 57 kDa-Komponente
 Poly(A⁺)mRNS aus *Neurospora* wurde in Anwesenheit von (³⁵S)Methionin in einem Kaninchen-Retikulozytenlysat translatiert. 100 µl des entsalzten postribosomalen Überstands wurden dem Standard-Prozessierungstest unterzogen. Dabei war entweder keine Prozessierungs-Peptidase anwesend (*Spur 1*), oder die Proben enthielten 10 Einheiten/ml des gereinigten Enzyms (*Spur 2* und *3*). *Spur 3* enthielt während der Inkubation zusätzlich NaCl (300 mM) und EDTA (5 mM). Nach Beendigung der Prozessierungsreaktion wurden aus den einzelnen Ansätzen die 52 kDa-Komponenten (A) und 57 kDa-Komponenten (B) durch Immunfällung isoliert und durch SDS-Gelelektrophorese und Fluorographie analysiert. Zum Vergleich wurden die reifen Formen beider Komponenten aus (³⁵S)Sulfat-markierten Mitochondrien (20 µg in A; 100 µg in B) analysiert (*Spur 4*). Zur Verdeutlichung der Signale in (B) wurde eine schematische Zeichnung angefertigt (C).

3.8. Biogenese der Prozessierungs-Peptidase

Die Biosynthese der beiden Komponenten des Prozessierungsenzyms sollte untersucht werden. Insbesondere war die Frage, ob diese beiden Komponenten als größere Vorstufen synthetisiert werden, wie es für die überwiegende Mehrzahl der kernkodierten und in die Mitochondrien importierten Proteine der Fall ist.

3.8.1. *In vitro*-Translation der Vorstufen der 52 kDa -und 57 kDa-Proteine

Poly(A⁺)mRNS aus *Neurospora crassa* wurde im Retikulozyten-Translationssystem in Anwesenheit von (³⁵S)Methionin translatiert. Das translatierte Retikulozytenlysate, das ein Gemisch verschiedener radioaktiv markierter Proteine enthielt, wurde mit Antikörpern gegen das 52 kDa -bzw. 57 kDa-Protein inkubiert. Zum Vergleich wurden SDS-solubilisierete Mitochondrien aus einer (³⁵S)Sulfat-markierten *Neurospora*-Kultur mit den gleichen Antisera behandelt. In Abbildung 18 sind die Präzipitate nach SDS-Gelelektrophorese und Fluorographie gezeigt. Die 52 kDa-Komponente des Prozessierungsenzyms wurde demnach als höhermolekulare Vorstufe synthetisiert (Abbildung 18A, vgl. Spur 1 und 4). Der Unterschied im apparenten Molekulargewicht zwischen Vorstufe und reifem, immunisiertem Protein betrug ca. 3 000. Für die 57 kDa-Komponente erlaubt das Experiment keine eindeutige Aussage. Trotz längerer Expositionszeit (4 Wochen) des Röntgenfilms war das spezifische Signal nur sehr schwach (Abbildung 18B). Bei direkter Betrachtung des Röntgenfilms unter optimalen Bedingungen schien ein sehr geringer Unterschied im apparenten Molekulargewicht (ca. 1 000) zwischen "Vorstufe" (Spur 1) und "reifer Form" (Spur 4) zu bestehen. Präsequenzen so geringer Größe wurden für Untereinheiten des Cytochrom bc₁-Komplexes beschrieben.

3.8.2. Prozessierung der Vorstufen des 52 kDa-Proteins und 57 kDa-Proteins durch die Prozessierungs-Peptidase

Im Hinblick auf die Biogenese des Prozessierungsenzyms ist es interessant, ob die Abspaltung der Präsequenz der 52 kDa-Vorstufe (und eventuell der 57 kDa-"Vorstufe") durch die Prozessierungs-Peptidase selbst katalysiert wird. Translatiertes Lysat wurde entsalzt und mit der gereinigten Prozessierungs-Peptidase unter Standardbedingungen inkubiert. In einem Parallelansatz wurde die Inkubation in Anwesenheit von 5 mM EDTA und 300 mM NaCl durchgeführt. Abbildung 18A demonstriert, daß die Vorstufe des 52 kDa-Proteins vom gereinigten Enzym in die reife Form übergeführt wurde (Spur 2). Die Prozessierung wurde gehemmt durch 5 mM EDTA/300 mM NaCl (Spur 3). Entsprechendes galt für die "Vorstufe" des 57 kDa-Proteins (Abbildung 18B und C, Spur 2 und 3). Beide isolierten Komponenten

des Prozessierungsenzyms sind also daran beteiligt, ihre vermutlich inaktiven Vorstufen in die aktive reife Form zu überführen.

3.9. Beziehungen zwischen dem 52 kDa-Protein und dem Mas 1-Protein aus Hefe

Es sind temperatursensitive Hefemutanten der mitochondrialen Assemblierung (Mas) beschrieben worden, die bei nicht-permissiver Temperatur unprozessierte Vorstufen akkumulieren (Yaffe und Schatz, 1984; Yaffe et al., 1985). Eine dieser Mutanten, Mas 1, ist defizient in der Aktivität des Prozessierungs-Enzyms. Das betroffene Gen wurde isoliert und sequenziert (Witte et al., 1988). Gegen ein aminoterminal Peptid dieses Proteins wurde ein Antiserum gewonnen, das zur Untersuchung der möglichen Verwandtschaft zwischen dem Mas 1-Protein und dem aus *Neurospora* isolierten Prozessierungsenzym zur Verfügung stand.

Mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotting wurden mitochondriale Extrakte aus *Neurospora* und Hefe sowie das gereinigte Prozessierungsenzym unter Verwendung des Mas 1-Antiserums analysiert (Abbildung 19). Antikörper gegen Mas 1 reagierten mit einem Protein aus *Neurospora*-Mitochondrien mit einem apparenten Molekulargewicht von 52 000. Im Falle von Hefemitochondrien (Spur 1 und 2) wurde ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 48 000 markiert. Nach Immunoblotting der isolierten Prozessierungs-Peptidase aus *Neurospora* wurde die 52 kDa-Komponente spezifisch erkannt. Das 48 kDa-Protein aus Hefe (Mas 1-Protein) ist offenbar der nicht katalytischen 52 kDa-Komponente des Prozessierungsenzyms aus *Neurospora* äquivalent.

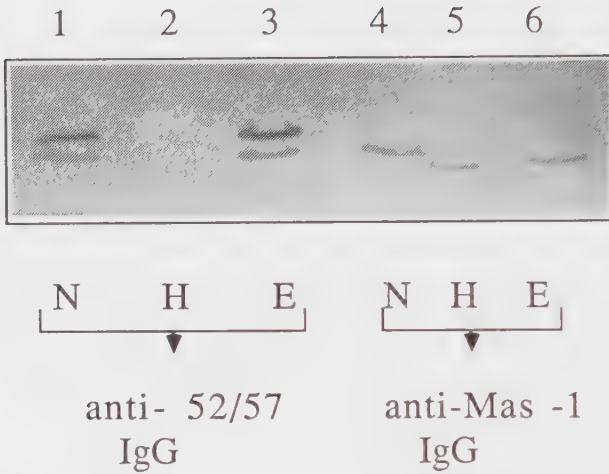


ABBILDUNG 19: Homologie der Proteine PSP und Mas 1-Antigen

Mitochondriale Tritonextrakte (100 µg) aus *Neurospora* (Spur 1,4) und Hefe (Spur 2,5), sowie das Eluat der Ectocella-Cellulose Chromatographie (Spur 3,6) wurden durch SDS-PAGE, Immuno-Blotting und Autoradiographie analysiert. Die auf die Nitrocellulose transferierten Proteine wurden mit Antiseren gegen 52 kDa -und 57 kDa-Komponente (1-3) oder Mas 1-Antigen (4-6) immundekoriert und mit (^{14}C)Protein A radioaktiv markiert. *Abkürzungen:* N=mitochondrialer Extrakt aus *Neurospora crassa*; H=mitochondrialer Extrakt aus Hefe; E=Eluat der Ectocella-Cellulose-Chromatographie.

4. DISKUSSION

4.1. Reinigung der Prozessierungs-Peptidase: technische Aspekte

Das Verständnis der komplexen Mechanismen der Biogenese von Organellen erfordert letztlich die Isolierung der daran beteiligten Komponenten. Dabei ist der methodische Aufwand schon allein deswegen erheblich, weil die zu reinigenden Komponenten zum Teil in sehr geringen Mengen in der Ausgangsfraction enthalten sind. Nur wenige am Proteintransport beteiligte Komponenten, wie z.B. das Signal-Erkennungs-Partikel (SRP) (Blobel und Dobberstein, 1975a,b) und das Docking Protein des endoplasmatischen Retikulums (Meyer und Dobberstein, 1980; Walter und Blobel, 1980; Gilmore et al., 1982a,b) oder die Leader-Peptidase aus *E.coli* (Zwizinski und Wickner, 1980) konnten bisher gereinigt und charakterisiert werden. Die Isolierung der mitochondrialen Prozessierungs-Peptidase scheiterte bisher nicht zuletzt deswegen, weil bereits nach wenigen Reinigungsschritten die erhaltene Proteinmenge für weitere Isolierungsstufen nicht mehr ausreichte (McAda und Douglas, 1982; Böhni et al., 1983; Sagara et al., 1984; Kumamoto et al., 1986).

Ausgehend von einem hypotonischen Zellextrakt von *Neurospora crassa* ist es hier erstmals gelungen, die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase in reiner Form zu gewinnen. Für die Wahl eines Gesamt-Zellextrakts als Ausgangsfraction anstelle isolierter Mitochondrien, wie dies z.B. bei den partiellen Reinigungsverfahren des Hefeenzym (McAda und Douglas, 1982; Böhni et al., 1983) beschrieben wurde, sprach folgender Befund: Zwar ließen sich im kleinen Maßstab die löslichen Proteine der mitochondrialen Matrix durch Beschallen quantitativ extrahieren. Bei der Aufarbeitung größerer Mengen isolierter Mitochondrien (gewonnen aus ca. 50 g Zellen) konnten jedoch mit der verfügbaren Ultraschallquelle nur ca. 10% der Matrixproteine extrahiert werden. Diese niedrige Ausbeute hätte somit bereits im ersten Reinigungsschritt den Verlust von 90% des Enzyms zur Folge gehabt.

Bei der Suche nach geeigneten Reinigungsmethoden wurde eine Reihe vielfach erprobter Trennverfahren überprüft. Chromatographien an Hydroxyapatit, Dichtegradienten-Zentrifugation, Ammoniumsulfat-induzierte Phasentrennung (Parish et al., 1986), ergaben keine zufriedenstellende Anreicherung der Enzymaktivität. Gelfiltration, Ammoniumsulfatfällung, Ethanol-fällung, Ionen-Filtrations-Chromatographie (Kierkegard, 1976) und hydrophobe Chromatographie brachten nur sehr geringe Ausbeuten. Oft lag die Ursache des beobachteten Aktivitätsverlusts in der Trennung der beiden erforderlichen Komponenten, wie z.B. bei der Gelfiltration an Superose 12. Bei der hydrophoben

Chromatographie (nicht gezeigt) kam es zur Bindung der 57 kDa-Komponente an das Säulenmaterial (Phenyl-Sepharose). Unter schonenden, nicht denaturierenden Bedingungen war die Aktivität nicht mehr zu eluieren.

Es kamen also nur solche Reinigungsmethoden in Frage, bei denen beide Komponenten des Prozessierungsenzyms kofraktionierten. Nur unter dieser Bedingung konnten hohe Ausbeuten der Aktivität erzielt werden. Dies gelang durch Anionenaustausch-Chromatographien (an DEAE-Cellulose, PEI-Cellulose und Ecteola-Cellulose), eine Metall-Affinitäts-Chromatographie und eine Polyethylenglycol-Fällung. Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms war 10 000-fach höher als die des Ausgangsmaterials (Zellextrakt), bei einer Ausbeute von 6%.

4.2. Erfordernis von zwei Komponenten für die Prozessierung mitochondrialer Vorstufenproteine: Mitochondriale Prozessierungs-Peptidase (MPP) und Prozessierungs-stimulierendes Protein (PSP)

Das Eluat der als letzter Reinigungsschritt angewendeten Ecteola-Cellulose-Chromatographie enthielt zwei Polypeptide mit Molmassen von 57 und 52 kDa. Beide Proteine waren immunologisch nicht verwandt. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, daß die 52 kDa-Komponente durch Proteolyse aus der 57 kDa-Komponente hervorgegangen war. Limitierte Proteolyse (nicht gezeigt) der 57 kDa-Komponente mit verschiedenen Proteasen lieferte diskrete Fragmente, jedoch kein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 52 000.

Eine Reihe von Experimenten zeigte, daß beide Komponenten zur gemessenen enzymatischen Aktivität beitrugen. So wurde die Aktivität nach Gelfiltration im Überlappungsbereich zwischen der 57 kDa -und der 52 kDa-Komponenten wiedergefunden. Nach der Trennung der Komponenten durch Gelfiltration oder Immunfällung war die Ausbeute der Aktivität niedrig. Die volle enzymatische Aktivität konnte jeweils wiederhergestellt werden, wenn 57 kDa-Komponente und 52 kDa-Komponente enthaltende Fraktionen wiedervereinigt wurden.

Mehrere Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die beiden Komponenten keinen Komplex ausbilden: 1) Zumindest unter den vorliegenden Bedingungen führte Gelfiltration selbst bei niedrigen Salzkonzentrationen (von 50 mM bis zu 200 mM) zu einer Trennung beider Komponenten. 2) Die Enzymaktivität eluierte nach Gelfiltration bei einem Molekulargewicht von ca. 60 000, lag also im Bereich des apparenten Molekulargewichts der monomeren Komponenten. Das hier bestimmte native Molekulargewicht von 60 000 stimmt mit demjenigen für das Enzym aus den Mitochondrien der Nebennierenrinde (Kumamoto et

al., 1986) gut überein. Im Elutionsbereich von 120 kDa, der einem Heterodimer entsprochen hätte, konnte keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Ein solcher Wert (115 kDa) wurde für das Enzym aus Hefemitochondrien angegeben (McAda und Douglas, 1982; Böhni et al., 1983). 3) Selbst bei niedrigen Ionenstärken konnte mit keinem der beiden spezifischen Antisera das jeweils nicht komplementäre Antigen kopräzipitiert werden. 4) Die beiden Proteine kommen in den Mitochondrien mit sehr verschiedener Häufigkeit vor. Die 52 kDa-Komponente ist etwa 15-fach stärker vertreten als die 57 kDa-Komponente. Beide Komponenten wurden kloniert (Schneider und Tropschug, pers. Mitt.). Die relative Häufigkeit der speziellen cDNA-Klone in der *Neurospora* cDNA-Bank entsprach der durch Immunpräzipitation gemessenen relativen Häufigkeit der Proteine.

Die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase stellt somit ein proteolytisches Enzym mit ungewöhnlichem Aufbau und Mechanismus dar. Anders als beispielsweise die zytosolischen ATP-abhängigen Proteasen "La" (Goldberg et al., 1981) und "Ti" (Katayama-Fujimura et al., 1987; Hwang et al., 1987) aus *E.coli*, die einen Komplex aus identischen Untereinheiten bilden, ist hier die enzymatische Aktivität von zwei verschiedenen Komponenten abhängig, die offenbar keinen Komplex ausbilden.

In Abwesenheit des 52 kDa-Proteins besaß die 57 kDa-Komponente eine zwar geringe aber signifikante Prozessierungsaktivität. Daraus war zu schließen, daß es sich bei dem 57 kDa-Protein um diejenige Komponente handelte, die das katalytische Zentrum zur hydrolytischen Spaltung der Peptidbindung trägt und somit das eigentliche Enzym darstellt. Sie wurde deshalb als die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase bezeichnet (*MPP*). Andererseits konnte eine Prozessierung von Vorstufenproteinen durch das 52 kDa-Protein allein auch mit den höchsten im Test eingesetzten Mengen nicht nachgewiesen werden. Das 52 kDa-Protein hatte vielmehr das Charakteristikum, die Prozessierungsaktivität von *MPP* zu stimulieren. Aus diesem Grunde wurde es "Prozessierungs-stimulierendes Protein" (*PSP*) genannt. Etwa äquimolare Mengen von *PSP* waren zur maximalen Aktivierung von *MPP* ausreichend (vgl. Abb. 8). Daraus folgt, daß *PSP* in Mitochondrien auch funktionell im Überschuß zu *MPP* vorkommt.

4.3. Interaktion der beiden Komponenten *MPP* und *PSP* bei der Prozessierung von Vorstufenproteinen - Hypothese zum Prozessierungsmechanismus

Wie kommt die Stimulierung der Prozessierungsaktivität durch *PSP* zustande? Zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen einer Interaktion von *MPP* und *PSP* sind vorstellbar:

a) Direkte Aktivierung von MPP durch PSP: Eine Reihe von Proteasen werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) synthetisiert und erst durch spezifische proteolytische Spaltung von Peptidbindungen am späteren Funktionsort aktiviert. So werden bei Säugern die Proteasen des Dünndarms, wie Trypsin oder Chymotrypsin, als inaktive, höhermolekulare Vorstufen im Pankreas synthetisiert. Ein weiteres Beispiel sind die bei der Regulation der Blutgerinnung beteiligten Proteasen. Fibrinogen wird durch Einwirkung der spezifischen Protease Thrombin in Fibrin umgewandelt. Thrombin, als inaktives Prothrombin in der Leber synthetisiert, wird erst durch Einwirkung des Gerinnungsfaktors X aktiv, der selbst als Zymogen hergestellt wird. Diese Beispiele illustrieren zweierlei: Zum einen kann ein solcher Mechanismus der Aktivierung verhindern, daß Proteasen am falschen Ort wirksam werden. Zum anderen bietet sich durch proteolytische Eingriffe die Möglichkeit, gezielt und genau abgestimmt auf Abweichungen vom "Normalzustand" zu reagieren. Ein entscheidendes Kriterium für diese beschriebene Art der Regulation von Enzymen ist es, daß hierarchisch höherstehende Komponenten solcher Kaskaden seltener auftreten als die ihnen untergeordneten. Gerinnungsfaktor X besitzt im Serum eine Konzentration von 0,01 mg/ml, Fibrinogen dagegen ca. 3 mg/ml. Demgegenüber ist die Situation beim mitochondrialen Prozessierungsenzym gerade umgekehrt. *PSP*, die aktivierende Komponente, ist etwa 15-fach häufiger als *MPP*. Auch aufgrund folgender Überlegung ist auszuschließen, daß der stimulierende Effekt von *PSP* auf eine proteolytische Aktivierung von *MPP* zurückzuführen ist: *PSP* aktiviert die von dem bereits aktiven Enzym abgetrennte *MPP*-Komponente. Die stimulierende Wirkung von *PSP* ist durch erneutes Trennen und Wiedervereinen der Komponenten wiederholt demonstrierbar. Ein Mechanismus hierarchischer Proteasekaskaden dürfte somit nicht die Grundlage der Stimulierung der Prozessierung sein.

Eine andere Möglichkeit der Stimulierung wäre die Phosphorylierung inaktiver Vorstufen, wie dies zum Beispiel für cAMP-abhängige Protein-Kinasen bekannt ist. Diese aktivieren eine Reihe von Proteinen wie Histone, Phosphorylase-Kinase oder auch mitochondriale Membranproteine. Dieser Mechanismus ist für die Aktivierung der mitochondrialen Prozessierungs-Peptidase ebenfalls unwahrscheinlich. Die Prozessierung von Vorstufenproteinen findet in entsalztem Medium statt, sodaß die Konzentration an freien Nucleotiden oder cAMP nur sehr gering sein dürfte. Es kann allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden, daß sehr geringe Konzentrationen zur Stimulierung von *MPP* bereits ausreichen.

b) *PSP interagiert zunächst mit den zu prozessierenden Vorstufenproteinen:* Eine der wesentlichen Fragen für ein Verständnis des enzymatischen Mechanismus der Prozessierungs-Peptidase ist, wie das Enzym in der Lage ist, so viele verschiedene Vorstufen mit variabler Aminosäurezusammensetzung zu erkennen, zu binden und zu spalten. *PSP*

könnte zur Spezifität der Spaltreaktion beitragen, indem es zunächst die zu spaltende Vorstufe erkennt und bindet. Erkennungsmotiv könnte eine bestimmte Sekundärstruktur der Präsequenz sein, z.B. die Struktur einer amphiphilen α -Helix, die wahrscheinlich bei den meisten Präsequenzen vorliegt (v.Heijne, 1986a). Die Bindung von *PSP* an die Präsequenz könnte dabei schon während oder unmittelbar nach dem Transfer des Vorstufenproteins über die Innenmembran der Mitochondrien stattfinden. Dies könnte beitragen zu verhindern, daß die bei der Translokation über die Membran entfalteten Polypeptide (Schleyer und Neupert, 1985; Eilers und Schatz, 1986) in eine prozessierungs-inkompetente Form zurückfalten. Andererseits könnte die Interaktion von *PSP* mit der Präsequenz der Vorstufe die proteolytische Schnittstelle freilegen und sie somit für *MPP* zugänglich machen. *MPP* müßte dann das mit der Vorstufe beladene *PSP* erkennen und an der exponierten Schnittstelle spalten. Unterschiedliche Konformationen zwischen beladener und unbeladener Form des *PSP* könnte bei der Spezifität dieses Vorgangs eine Rolle spielen. Strukturelle Merkmale der Spaltstellen einer Reihe von Vorstufenproteinen wie die Nähe basischer (an Position -2 oder -3) und kleiner Aminosäuren (an Position -1) würden dann genügen, um Prozessierung mit hoher Effizienz und Genauigkeit sicherzustellen.

4.4. Spezifität des mitochondrialen Prozessierungsenzyms

Unklarheit bestand bisher darüber, ob für die Abspaltung der Signalsequenzen einer Vielzahl mitochondrialer Vorstufenproteine mehrere oder nur eine einzige Prozessierungs-Peptidase zuständig sind. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint letzteres der Fall zu sein. Das gereinigte Enzym war in der Lage, bei allen überprüften Vorstufenproteinen die jeweilige Präsequenz abzuspalten. Prozessiert wurden die ATPase-Untereinheiten 2 und 9, Cytochrom *c*₁, und das Rieske Fe/S-Protein aus *Neurospora crassa*. Die funktionellen Formen dieser Proteine sind in unterschiedlichen submitochondrialen Kompartimenten lokalisiert (Matrix, Innenmembran, Intermembranraum). Auch ein Fusionsprotein, bestehend aus einer mitochondrialen Präsequenz und einem nichtmitochondrialen löslichen Protein (Dihydrofolatreduktase) wurde als Substrat akzeptiert.

Somit stellt sich die Frage, welche gemeinsamen strukturellen Motive der Vorstufen bei ihrer Erkennung und Prozessierung durch die Prozessierungs-Peptidase wichtig sind. Die Primärstrukturen einer Reihe mitochondrialer Vorstufenproteine sind bekannt (Übersicht bei Nicholson und Neupert, 1988). Ein Vergleich der Schnittstellen der Prozessierungs-Peptidase läßt keine strikte Konsensussequenz erkennen. Folgende Gemeinsamkeiten fallen jedoch auf: Die Positionen -2 und (seltener) -3 sind oft von basischen Aminosäuren besetzt, meist durch

Arginin, in einigen Fällen auch durch Lysin. An Position -1 steht häufig Alanin. An Position +1 findet man Serin, Tyrosin, Alanin, Leucin oder Isoleucin. Einschränkend sollte jedoch erwähnt werden, daß dies im wesentlichen nur für die Vorstufen niederer Eukaryonten gilt. Die Spaltstellen von Vorstufen höherer Eukaryonten entsprechen nur in wenigen Fällen diesem Schema. Dabei spielt möglicherweise eine Rolle, daß die Spaltstellen nicht immer verläßlich bestimmt sind.

Auffallend ist die Ähnlichkeit der beiden Schnittstellen der Vorstufe der ATPase-Untereinheit 9 (s. Tabelle II). Dieses Vorstufenprotein wird in *Neurospora* anders als in Hefe und höheren Eukaryonten im Kern kodiert und mit einer sehr langen Präsequenz von 66 Aminosäuren im Cytoplasma synthetisiert (Viebrock et al., 1982). Die Prozessierung erfolgt zweistufig (Schmidt et al., 1984). Beide Schnittstellen wurden durch Radiosequenzierung ermittelt. Das Motiv dieser Schnittstellenregionen findet man in ähnlicher Form an zwei Stellen der Präsequenz der Cytochrom c-Peroxidase aus Hefe (Kaput et al., 1982) und des Cytochrom b₂, wo die tatsächlichen Schnittstellen jedoch nicht bekannt sind. Diese wurden hingegen durch Radiosequenzierung bestimmt bei der Cytochromoxidase-Untereinheit V aus Hefe (Cerletti et al., 1983), der ATPase-Untereinheit 9 (Schmidt et al., 1984) und des "Rieske" Fe/S-Proteins (Hartl et al., 1986) aus *Neurospora*. Eine andere Möglichkeit zur Ermittlung der Schnittstelle ist die indirekte Ableitung durch Vergleich der aus der cDNA übersetzten Aminosäuresequenz der Vorstufe mit der aminoterminalen Sequenz des isolierten Proteins (Cytochromoxidase-Untereinheit V aus *Neurospora*).

Die Primärstrukturen der Präsequenzen der ATPase-UE 2 aus *Neurospora* (Rassow, 1987) und Hefe (Takeda et al., 1985) unterscheiden sich erheblich. Die *Neurospora*-Sequenz besitzt eine den oben erwähnten Kriterien entsprechende, mögliche Schnittstelle. Die authentische Schnittstelle konnte jedoch bisher nicht ermittelt werden. Die Schnittstelle des Hefeproteins wurde durch Radiosequenzierung bestimmt (Vassarotti et al., 1987). Ihre Struktur weicht jedoch deutlich von denen "typischer" Schnittstellen ab. Eine dazu ähnliche Aminosäuresequenz tritt wenige Aminosäuren entfernt in aminoteriminaler Richtung auf (s. Tabelle II; vgl. Nicholson und Neupert, 1988). Es könnte sich hierbei um eine bisher nicht bemerkte intermediäre Schnittstelle handeln.

Aus der Literatur geht hervor, daß auch weiter von der Schnittstelle entfernte Bereiche des Vorstufenproteins zur spezifischen Erkennung durch das Prozessierungsenzym beitragen. Aus der Beobachtung, daß Alkali-denaturierte Vorstufen nicht prozessiert werden (Böhni et al., 1980; Miura et al., 1986), könnte man ableiten, daß bestimmte Sekundärstrukturen bei der Erkennung eine Rolle spielen.

Hurt et al. (1985) konstruierten ein Fusionsprotein aus den 22 aminoterminalen Aminosäuren der Präsequenz der Cytochromoxidase-Untereinheit IV und Dihydrofolatreduktase. Obwohl diesem Konstrukt die authentische Schnittstelle fehlt (sie

Tabelle II: Ähnlichkeit der Primärstrukturen im Bereich der Schnittstellen der Prozessierungs-Peptidase bei verschiedenen mitochondrialen Vorstufenproteinen

Vorstufe	Organismus	Radiosequ.	Sequenz	Produkt
<i>Authentische Schnittstelle wurde bestimmt</i>				
ATPase-UE 9	<i>Neurospora</i>	+	(31)VSKRT ↓ IQ	I
ATPase-UE 9	<i>Neurospora</i>	+	(62)FQKRA ↓ YS	R
Cox V	<i>Sacch.cer.</i>	+	(16)TSVRF ↓ AQ	R
Cox V	<i>Neurospora</i>	-	(23)MAVRA ↓ AS	R
Fe/S-Protein	<i>Neurospora</i>	+	(20)RAVRA ↓ LT	I
ATPase-UE 2(1)	<i>Sacch.cer.</i>	+	(15)FKAAR ↓ QS	R
<i>Authentische Schnittstelle nicht bekannt</i>				
Cyt. b ₂	<i>Sacch.cer.</i>	-	(17)AILRA	SK I
Cyt. b ₂	<i>Sacch.cer.</i>	-	(48)SRQRT	QS I
Cyt. c-Per.	<i>Sacch.cer.</i>	-	(15)AHKRS	LY I
Cyt. c-Per.	<i>Sacch.cer.</i>	-	(41)SHKRS	SS I
ATPase-UE 2(2)	<i>Sacch.cer.</i>	-	(13)AAFKA	AK I?
ATPase-UE 2	<i>Neurospora</i>	-	(20)ASRRA	NR I,R?

Ausschnitte der Primärsequenzen der aminoterminalen Präpeptide mitochondrialer Vorstufenproteine sind (im Einzel-Buchstaben-Code aufgelistet. Die Nummer der ersten Aminosäure zeigt die Position der Sequenz innerhalb des Präpeptids an (Aminoterminus: (1)Met). Wenn bekannt, ist die Schnittstelle der Prozessierungs-Peptidase durch einen senkrechten Pfeil markiert. Es ist angegeben, ob die Bestimmung der Schnittstelle durch Radiosequenzierung des Prozessierungsprodukts erfolgt war (+), oder nicht (-). Die Prozessierung führte entweder zu einer intermediären (I) oder zur reifen Form (R).

(1),(2)Die durch Radiosequenzierung ermittelte Schnittstelle⁽¹⁾ (Vassarotti et al., 1987a) ähnelt denen der anderen hier angeführten importierten Vorstufenproteinen nicht, wohl aber eine weiter aminoterminal gelegene Aminosäureabfolge⁽²⁾. Ob es sich hierbei um eine (mögliche) intermediäre Schnittstelle handelt, ist nicht bekannt.

Abk.: Cox V=Cytochromoxidase-UE V; Cyt. b₂=Cytochrom b₂; Cyt. c-Per. = Cytochrom c-Peroxidase

liegt zwischen den Aminosäuren 25 und 26 des Vorstufenproteins), wurde das Fusionsprotein prozessiert. Wie die Daten der Radiosequenzierung zeigten, lag die neue Spaltstelle zwischen Aminosäure 17 und 18 der Präsequenz. Die angrenzenden Bereiche wiesen keinerlei Homologie zu der authentischen Schnittstelle auf. In einer weiteren Arbeit demonstrierten die

Autoren, daß nach Entfernung von vier aminoterminalen Aminosäuren der Präsequenz die Prozessierung durch die Matrixprotease vollständig unterbunden war (Hurt et al., 1987). Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß der aminoterminal Bereich der Präsequenz der Cytochromoxidase-Untereinheit IV Einfluß auf die korrekte Prozessierung besitzt.

Bei anderen Vorstufen scheint ein Mittelbereich kritisch zu sein. Beispielsweise enthält die Präsequenz der mitochondrialen Ornithintranscarbamylase (OTC) des Menschen vier Argininreste (Horwich et al., 1984), die sowohl für den Import als auch die Prozessierung durch die Matrixprotease erforderlich sind (Horwich et al., 1985a; Horwich et al., 1986). Durch *in vitro*-Mutagenese wurden OTC-Varianten erzeugt, bei denen entweder einzelne Arginine durch Glycin, Alanin oder Lysin substituiert, oder zusammenhängende Abschnitte der Präsequenz deletiert waren. Die Autoren fanden kritische Bereiche für Import und Prozessierung. Arginin an Position 23 war für beide Vorgänge von entscheidender Bedeutung. Dafür sprachen folgende Beobachtungen: 1) die OTC-Vorstufe, die an Stelle von Arginin das ladungsneutrale Canavanin enthielt, wurde nicht prozessiert (Horwich et al. 1985b); 2) Austausch von Arginin mit Glycin an Position 23 verhinderte Import und Prozessierung; 3) Substitution dieses Glycinrestes mit Lysin aber auch mit Asparagin und Alanin konnte Import und Prozessierung teilweise wiederherstellen; 4) Insertion eines Tetrapeptids (-*ala-ala-ala-ile*-) in eine prozessierungs-und importinaktive Deletionsmutante (d8-22) stellte den Wildtyp-Phänotyp wieder her. Die zusammenfassende Betrachtung dieser Beobachtungen läßt den Schluß zu, daß weniger die positive Ladung der Aminosäure an Position 23 (Arginin) an sich wichtig ist für die Prozessierung, als vielmehr die Art der Sekundärstruktur, zu der sie in diesem Mittelbereich beiträgt. Grundlage zu der berechtigten Annahme, daß dies eine α -Helix sein könnte, stellen Arbeiten von Chou und Fasman (1974, 1978) dar. Demnach besitzt Alanin ein hohes Potential zur Ausbildung einer α -Helix, Glycin dagegen gilt als Helixbrecher.

Ähnliche Ergebnisse publizierten Nguyen et al. (1987) mit ihren Deletionsmutanten der Rattenleber-Ornithintranscarbamylase. Ein kritischer Bereich für die Prozessierung wurde zwischen Aminosäure 22 und 30 der Präsequenz gefunden. Die mutierten Proteine akkumulierten als unprozessierte Vorstufen in Mitochondrien. In diesem Fall war das Importsignal offensichtlich erhalten, was frühere Arbeiten von Zwizinski und Neupert (1983), Hartl et al. (1986) und Ou et al. (1986) bestätigt, die zeigen konnten, daß Import und Prozessierung zwei voneinander unabhängige Vorgänge sind.

Daß auch Teile des reifen Proteins die Spezifität der proteolytischen Prozessierung beeinflussen können, demonstrierten Arbeiten von Nguyen et al. (1986) und Vassarotti et al. (1987a). Im einen Fall wurde gezeigt, daß korrekte Prozessierung eines Fusionsproteins aus der Präsequenz der Ornithintranscarbamylase (aus Rattenleber) und Asparaginsynthase (aus

E.coli) nur dann erfolgte, wenn das Konstrukt zusätzlich 28 Aminosäuren des reifen Proteins der OTC enthielt. Im anderen Fall wurde die ATPase-Untereinheit 2 aus Hefe trotz Vorliegens der authentischen Schnittstelle nicht prozessiert, wenn bestimmte aminoterminalen Bereiche im reifen Teil des Proteins deletiert waren.

Der derzeitige Wissensstand erlaubt nach wie vor keine klare Aussage darüber, welche Eigenschaften der Vorstufenproteine für die Erkennung und Prozessierung durch die Prozessierungs-Peptidase erforderlich sind. Möglicherweise wirken mehrere Faktoren zusammen: definierte Sekundärstrukturen in Bereichen, die von der Spaltregion entfernt sind (in N-terminaler und/oder C-terminaler Richtung), aber auch bestimmte Aminosäurereste im Bereich der eigentlichen Schnittstellen. Das im vorigen Abschnitt beschriebene Modell des Zusammenwirkens der beiden Komponenten *PSP* und *MPP* bietet hierzu eine passende Ergänzung.

4.5. Beteiligung weiterer Prozessierungsenzyme an der Spaltung von mitochondrialen Vorstufen mit komplexen Präsequenzen

Mehrere Proteine werden beim Import in Mitochondrien in zwei Stufen prozessiert. Dies wurde beschrieben für Cytochrom *b*₂ aus Hefe (Gasser et al., 1982; Reid et al., 1982; Daum et al., 1982), Cytochrom *c* Peroxidase aus Hefe (Reid et al., 1982), Cytochrom *c*₁ aus Hefe und *Neurospora* (Gasser et al., 1982; Ohashi et al., 1982; Teintze et al., 1982; Schleyer und Neupert, 1985), das "Rieske" Fe/S Protein des bc₁-Komplexes aus Hefe und *Neurospora* (Sidhu und Beattie, 1983; Hartl et al., 1986), die ATPase-Untereinheit 9 aus *Neurospora*, (Schmidt et al., 1984), die Ornithintranscarbamylase aus Rattenleber (Sztul et al., 1987).

In allen überprüften Fällen wurde der erste Prozessierungsschritt von der in der mitochondrialen Matrix lokalisierten Prozessierungs-Peptidase durchgeführt. Das gereinigte Enzym spaltete die Vorstufen von Cytochrom *c*₁, Cytochrom *b*₂ und dem "Rieske" Fe/S Protein bis zu einer intermediären Form, deren Molekulargewicht etwas größer als das der reifen Form ist. Mit Ausnahme der ATPase-Untereinheit 9 aus *Neurospora* (Schmidt et al., 1984) und der Ornithintranscarbamylase aus Rattenleber (Sztul et al., 1987), bei denen die zweite Prozessierung offenbar vom selben Enzym durchgeführt wird, werden für die Reifung der anderen Vorstufen zusätzliche Protease(n) benötigt, die vermutlich nicht in der Matrix lokalisiert sind. Eine Ausnahme stellt das "Rieske" Fe/S-Protein dar. Für dieses Protein gibt es experimentelle Befunde, die auch die zweite Prozessierung an der Innenseite der Innenmembran lokalisieren.

Außer der ATPase-Untereinheit 9 und der OTC sind alle bekannten zweistufig prozessierten Proteine im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert, und zwar entweder als lösliche Komponenten oder als Innenmembranproteine mit einer hydrophilen Domäne im Intermembranraum. In diesen Fällen findet der zweite Prozessierungsschritt an der Außenseite der Innenmembran statt. Er ist im Gegensatz zur Prozessierung durch die Prozessierungs-Peptidase durch Chelatoren nicht hemmbar (Daum et al., 1982; Ohashi et al., 1982; Reid et al., 1982; Hartl et al., 1987). Möglicherweise wird die zweite Prozessierung verschiedener Proteine durch unterschiedliche Proteasen durchgeführt. Aus Hefe wurde eine temperatursensitive *pet*-Mutante isoliert (Pratje und Guiard, 1983; 1986), die die Prozessierung von Cytochrom b₂ (ein kernkodiertes Protein) und Cytochromoxidase-Untereinheit II (ein mitochondrial kodiertes Protein) bei nicht-permissiver Temperatur nicht durchführen konnte. Die Reifung der Cytochrom c-Peroxidase wurde bei dieser Mutante jedoch nicht behindert.

4.6. Beziehung des Prozessierung-stimulierenden Proteins PSP zum Mas 1-Genprodukt aus Hefe

Bei der Suche nach Komponenten in *Saccharomyces cerevisiae*, die für die Biogenese mitochondrialer Proteine essentiell sind, isolierten Yaffe und Schatz (1984) temperatursensitive Mutanten, die bei nicht permissiver Temperatur mitochondriale Vorstufenproteine nicht mehr prozessierten. Diese wurden als **Mas**-Mutanten bezeichnet (Mitochondrial assembly). Mitochondrien aus der Mas 1-Mutante waren vergleichbar mit Wildtypmitochondrien in Bezug auf die Rate der oxidativen Phosphorylierung und in Bezug auf die Atmungskontrolle. Sie besaßen eine geringfügig reduzierte *in vitro*-Importrate. Jedoch wurden die Vorstufen wesentlich langsamer prozessiert, sowohl in *in vitro*-Importexperimenten als auch bei *in vitro*-Prozessierungsversuchen mit einer löslichen Matrixfraktion. Die nicht prozessierten Vorstufen waren nach dem Import *in vitro* in einer proteaseresistenten Umgebung, also innerhalb der Mitochondrien lokalisiert. *In vivo* akkumulierten die Vorstufen jedoch bereits außerhalb der Mitochondrien (Yaffe und Schatz, 1984). Daher bestand Zweifel, ob das Strukturgen des Prozessierungsenzyms selbst mutiert war, oder eine andere Komponente des Biogeneseapparats, was dann sekundär zu der verringerten Prozessierungsrate führte.

Witte et al. (1988) gelang es, aus der genomischen DNA von Hefe ein Fragment zu isolieren, das nach Transformation der Mas 1-Mutante den temperaturresistenten Phänotyp wiederherstellen konnte. Es konnte gezeigt werden, daß es sich dabei um ein essentielles Gen

handelt, dessen Deletion zu einem letalen Phänotyp führte. Das Gen wurde sequenziert und daraus die Aminosäuresequenz abgeleitet. Das Genprodukt hat ein Molekulargewicht von 51 000 und besitzt am Aminoterminal eine typische mitochondriale Präsequenz. Die reife Form des Proteins, die durch *in vitro*-Import oder Prozessierung durch die Matrixprotease erzeugt wurde, besaß ein Molekulargewicht von 48 000.

Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen das Mas 1-Genprodukt, die mit *PSP* aus *Neurospora* kreuzreagierten, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß es sich bei dem Mas 1-Protein um das Äquivalent des *PSP* aus *Neurospora* handelt. Wenn man davon ausgeht, daß auch in Hefe zwei Komponenten für die Prozessierungsaktivität benötigt werden und wenn man annimmt, daß die zweite katalytische Komponente in der Mutante normal exprimiert wird, dann wird verständlich, warum die betroffenen Zellen erst nach einer Verzögerung von zwei Generationszeiten bei erhöhter Temperatur ihr Wachstum einstellen (Yaffe und Schatz, 1984). Möglicherweise reicht die endogene Aktivität der katalytischen Komponente dazu aus, einen Aufschub des letalen Phänotyps für diese Zeitspanne zu erreichen. Die Anhäufung unprozessierter Vorstufenproteine in Mitochondrien könnte darüberhinaus nach dem Überschreiten einer Schwellenkonzentration zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führen. Roise et al. (1986) haben beschrieben, daß amphiphile α -Helices dies bewirken können. Diese sind ein gemeinsames Strukturmerkmal von mitochondrialen Präsequenzen (v.Heijne, 1986a). Sie werden vermutlich nach ihrer Freisetzung durch die Prozessierungs-Peptidase von einer "Signalpeptid-Peptidase" hydrolysiert. Zwei äquivalente Enzyme in *E. coli* wurde kürzlich beschrieben und isoliert (Novak et al., 1986). Diese waren identisch mit den bereits bekannten Proteasen "So" (Chung und Goldberg, 1983) und "Oligopeptidase" (Vimr et al., 1983). Die Verlangsamung der Prozessierungsrate (so z.B. bei Mas 1 bei nicht-permissiver Temperatur) würde die Entstehung des natürlichen Substrats dieser Peptidase erheblich verzögern und somit die Membranpotential-zerstörende Wirkung verstärken.

Weitere experimentelle Befunde unterstreichen, daß es sich bei den Proteinen aus Hefe und *Neurospora* um homologe Proteine handelt (Witte et al., 1988). Mit dem spezifischen Antiserum gegen *PSP* wurde in einer cDNA-Bank von *Neurospora* die für *PSP* kodierende cDNA selektiert. Die DNA-Sequenzierung zeigte, daß starke Ähnlichkeiten zur Sequenz des Hefegens bestanden. *PSP* besitzt ebenfalls eine aminoternale Präsequenz mit einem Molekulargewicht von ca. 3 000. Es ist ein kernkodierte Protein, das in Mitochondrien importiert wird.

4.7. Evolution von an der Translokation von Proteinen beteiligten Prozessierungspeptidasen

Die proteolytische Entfernung aminoterminaler Präsequenzen ist ein häufig beobachteter Vorgang bei der Translokation von Proteinen über verschiedene biologische Membranen. Die daran beteiligten Proteasen lassen sich nach ihren Eigenschaften in zwei Gruppen einteilen. In eine Gruppe fallen die Leader-Peptidase aus *E.coli* und die Signal-Peptidase der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Sowohl die Signalsequenzen prokaryotischer als auch eukaryotischer Proteine werden von diesen Enzymen entfernt (Talmadge et al., 1980; Müller et al., 1982; Watts et al., 1983). Beide Proteasen waren insensitive gegenüber vielen Proteaseinhibitoren wie TLCK, TPCK, o-Phenanthrolin, PMSF, Leupeptin, Pepstatin, Antipain, Bestatin (Wolfe et al., 1983b; Stern und Jackson, 1985). Sie sind durch Metallchelatoren nicht hemmbar. Ein weiteres Mitglied dieser Gruppe, die Prolipoprotein-Signal-Peptidase aus *E.coli*, zeichnet sich durch eine besondere Substratspezifität aus (Hussain et al., 1982) und ist hemmbar durch das Antibiotikum Globomycin (Dev et al., 1985). Diese Peptidase spaltet ausschließlich Lipoproteine; dies sind Proteine der bakteriellen Außenmembran, an die über Glyzerid-Thioester Lipide kovalent gebunden sind. Sie besitzen somit eine andere Struktur als die Substrate der Leader- und Signal-Peptidase. Beide Proteasen aus *E.coli*, die Leader-Peptidase und die Prolipoprotein-Signal-Peptidase, bestehen aus einem einzigen integralen Membranprotein mit einer periplasmatischen katalytischen Domäne. Die Gene wurden isoliert und sequenziert (Wolfe et al., 1983a; Innis et al., 1984). Die Signal-Peptidase ist vermutlich Bestandteil eines großen Membrankomplexes, der möglicherweise einen Translokationskanal ausbildet (Evans et al., 1986).

Die zweite Gruppe von Prozessierungsenzymen umfaßt die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase und das wahrscheinlich ähnliche Prozessierungsenzym aus dem Stroma der Chloroplasten (Robinson und Ellis, 1984). Diese Proteasen sind lösliche Proteine, sie werden aktiviert durch zweiwertige Metallionen und inhibiert durch Chelatoren. Zumindest für die mitochondriale Aktivität wurde ein Zusammenwirken zweier Komponenten nachgewiesen. Möglicherweise besteht ein ähnlicher Zwei-Komponenten-Mechanismus auch für das Enzym aus Chloroplasten.

Läßt sich die weitere mitochondriale Peptidase(n) für die zweite proteolytische Prozessierung von Intermembranraumproteinen in einer dieser beiden Gruppen von Prozessierungs-Proteasen einordnen? Bei der Charakterisierung des Importweges des Fe/S-Proteins des bc₁-Komplexes und der Cytochrome c₁ und b₂ (Hartl et al., 1986; Hartl et al., 1987) wurde festgestellt, daß diese Vorstufen zuerst in die mitochondriale Matrix hineintransportiert werden. Nach Abspaltung des aminoterminalen Teils ihrer Präsequenz durch

die Prozessierungs-Peptidase werden die entstandenen Intermediate über die Innenmembran in den Intermembranraum zurücktransportiert. Dieser scheinbar umständliche, von der Matrix ausgehende Assemblierungsweg kann als der "ursprüngliche" aufgefaßt werden. Mitochondrien, die sich gemäß der Endosymbionten-Hypothese aus einem bakteriellen Endosymbionten entwickelten, haben im Verlauf der Evolution einen Großteil ihrer Gene an den Kern der Wirtszelle transferiert. Zur Bewahrung der funktionellen Integrität der Mitochondrien mußten die jetzt im Zytosol synthetisierten Proteine in die Organellen rücktransportiert werden. Die Neuentwicklung eines Importapparats fand statt, bei dem Translokationskontaktstellen zwischen Außen- und Innenmembran eine wichtige Rolle spielen. Nach Import in die Matrix der Mitochondrien (das ehemalige Zytosol des Endosymbionten) können sie in die bereits im Endosymbionten entwickelten Wege der Membranintegration und Assemblierung einmünden. Tatsächlich zeigt der Rücktransport importierter Proteine von der Matrix über die Innenmembran (die Plasmamembran des Endosymbionten) Ähnlichkeit zum Mechanismus des Proteinexports in Bakterien. So ähnelt der zweite Teil der Präsequenz der Vorstufen von Cytochrom c₁ und Cytochrom b₂ strukturell den Leadersequenzen vieler sekretorischer Prokaryontenproteine (Hartl et al., 1987). Diese Sequenzen stellen das Signal für den Export aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum (das Periplasma des Endosymbionten) dar. Sie werden von Peptidasen an der Außenseite der Innenmembran abgespalten.

Die Prozessierungs-Peptidase der Matrix wäre in diesem Zusammenhang als eine "neu" entwickelte Komponente zu betrachten. Zwar wird sie wahrscheinlich nicht zur Translokation selbst benötigt (Zwizinski und Neupert, 1983; Lewin und Norman, 1983; Ou et al., 1986; Hartl et al., 1986), wohl aber um die korrekte Assemblierung als auch Einmündung importierter Proteine in "alte" Assemblierungswege zu ermöglichen.

Dagegen wären die Peptidasen der Außenseite der Innenmembran in eine Gruppe mit Leader-Peptidasen und Signal-Peptidasen einzuordnen. Sie waren bereits Bestandteil des ursprünglichen Sekretionsweges im Endosymbionten.

Aus Chloroplasten-Thylakoiden wurde kürzlich eine Protease angereichert, die bei der Reifung zweistufig prozessierter Chloroplastenproteine beteiligt ist (Kirwin et al., 1987). Substrate dieser Protease waren Intermediate, bei denen der aminoterminaler Teil der Präsequenz durch die Stromaprotease entfernt worden war.

Wenig ist bisher über die "alten" Peptidasen von Mitochondrien und Chloroplasten bekannt. Wie Leader-Peptidase und Signal-Peptidase sind sie integrale Membranbestandteile und insensitiv gegenüber Metallchelatoren. Durch Isolierung und genauere Charakterisierung dieser Enzyme wird sich überprüfen lassen, ob tatsächlich eine Homologie zur Leader-Peptidase aus Prokaryonten besteht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Kernkodierte Vorstufenproteine werden unter Abspaltung ihrer aminoterminalen Präsequenzen in die Matrix der Mitochondrien transportiert. Das für die proteolytische Spaltung verantwortliche Prozessierungsenzym von *Neurospora crassa* wurde gereinigt. Die gereinigte Enzympräparation wurde 10 000-fach gegenüber dem Gesamtzellextrakt angereichert. Die Ausbeute betrug ca. 6%.

Die gereinigte Präparation besteht aus zwei verschiedenen Polypeptiden, der Matrix-Prozessierungs-Peptidase (*MPP*) und dem Prozessierungs-stimulierenden Protein (*PSP*). Die beiden Proteine unterscheiden sich in ihren apparenten Molmassen (*MPP*: 57 kDa, *PSP*: 52 kDa), ihren isoelektrischen Punkten und ihren immunologischen Eigenschaften. Spezifische Antisera gegen die beiden Proteinkomponenten (57 kDa- oder 52 kDa-Protein) wurden hergestellt. Diese präzipitierten aus den gesamten mitochondrialen Proteinen jeweils selektiv die beiden Proteine und erkannten im Immunoblot von mitochondrialen Extrakten die zugehörigen Antigene.

Beide Komponenten wurden als Monomere isoliert. Sie liegen (jedenfalls in Abwesenheit von Substraten) nicht als assoziierter Komplex vor.

Der relative Anteil am mitochondrialen Gesamtprotein beträgt 0,03% für *MPP* und 0,45% für *PSP*. *MPP* ist somit in einer 15-fach geringeren Menge in Mitochondrien vorhanden als *PSP*.

Die Prozessierungsaktivität von *MPP* allein ist gering. *PSP* hingegen besitzt keine Prozessierungsaktivität. Durch Wiedervereinigung der isolierten Komponenten wird die volle Aktivität wiederhergestellt. *MPP* ist diejenige Komponente, die das katalytische Zentrum der proteolytischen Spaltung der Peptidbindungen der Substrate trägt. *PSP* steigert ihre Aktivität um einen Faktor von 10-20.

Die gereinigte Prozessierungs-Peptidase wurde hinsichtlich ihrer proteinchemischen und katalytischen Eigenschaften charakterisiert. Sie ist abhängig von der Ionenstärke des Testsystems und ist bei erhöhter Salzkonzentration (> 100 mM NaCl oder KCl) inaktiv. Die Peptidase wird durch Chelatoren wie EDTA inhibiert und durch Mn^{++} und andere zweiwertige Metallionen stimuliert. Infolgedessen kann man sie in die Familie der Metalloproteasen einordnen.

Das gereinigte Enzym prozessierte alle mitochondrialen Vorstufenproteine, die getestet wurden. Eine Chloroplastenvorstufe wurde ebenfalls prozessiert, jedoch zu Produkten mit niedrigeren apparenten Molekulargewichten, als das der isolierten reifen Form.

Das mitochondriale Prozessierungsenzym repräsentiert einen neuen Typ von "Signal Peptidase". Es unterscheidet sich erheblich von der bakteriellen Leader-Peptidase und der Signal-Peptidase des endoplasmatischen Retikulums.

6. ABKÜRZUNGEN

AMPDS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CANP	Kalzium aktivierte neutrale Protease
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	Impulse pro Minute
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
IgG	Immunglobulin G
kDa	kilo-Dalton
Mas	Mitochondrial assembly
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
MM	Magermilch
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
OTC	Ornithintranscarbamylase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Saccharose-EDTA-Mops
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRP	Signal recognition particle
SSR	Signal sequence receptor
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TLCK	Tosyllysylchloromethylketon

TPCK	Tosylphenylalanylchloromethylketon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
upm	Umdrehungen pro Minute

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Bachmair, A., Finley, D., und Varshavsky, A.** (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179-186.
- Baker, R.K., Bentivoglio, G.P., und Lively, M.D.** (1986). Partial purification of signal peptidase from hen oviduct. *J. Cell. Biochem.* **32**, 193-200.
- Bensadoun, A., und Weinstein, D.** (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**, 241-250.
- Blobel, G., und Dobberstein, B.** (1975a). Transfer of proteins across membranes 1. *J. Cell Biol.* **67**, 835-851.
- Blobel, G., und Dobberstein, B.** (1975b). Transfer of proteins across membranes 2. *J. Cell Biol.* **67**, 852-862.
- Bond, J.S., und Butler, P.E.** (1987). Intracellular proteases. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 333-364.
- Bonner, W.M.** (1983). Use of fluorography for sensitive isotope detection in polyacrylamid gels and related techniques. *Methods Enzymol.* **96**, 215-222.
- Bostian, K.A., Elliot, Q., Bussey, H., Burn, V., Smith, A., und Tipper, D.J.** (1984). Sequence of the prepro-toxin dsRNA gene of Type 1 killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell* **36**, 741-751.
- Böhni, P., Gasser, S., Leaver, C., und Schatz, G.** (1980). A matrix-localized mitochondrial protease processing cytoplasmically-made precursors to mitochondrial proteins. In "The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome" (Kroon, A.M., and Saccone, C., eds.), 423-433. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Böhni, P.C., Daum, G., und Schatz, G.** (1983). Import of proteins into mitochondria: Partial purification of a matrix-localized protease involved in cleavage of mitochondrial precursor polypeptides. *J. Biol. Chem.* **258**, 4937-4943.

- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Burnette, W.N.** (1981). "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Cerletti, N., Böhni, P.C., und Suda, K.** (1983). Import of proteins into mitochondria: isolated yeast mitochondria and a solubilized matrix protease correctly process cytochrome c oxidase subunit V at the NH₂ terminus. *J. Biol. Chem.* **258**, 4944-4949.
- Chamberlain, J.P.** (1979). Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with water-soluble fluor, sodium salicylate. *Anal. Biochem.* **98**, 132-135.
- Chen, L., und Thai, P.C.** (1985). ATP is essential for protein translocation into *Escherichia coli* membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4384-4388.
- Chen, W.-J., und Douglas, M.G.** (1987). Phosphodiester bond cleavage outside mitochondria is required for the completion of protein import into mitochondrial matrix. *Cell* **49**, 651-658.
- Chou, P.Y., und Fasman, C.D.** (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **13**, 222-245.
- Chou, P.Y., und Fasman, C.D.** (1978). Empirical predictions of protein conformation. *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 251-267.
- Chung, C.H., und Goldberg, A.L.** (1983). Purification and characterization of protease So, a cytoplasmic serine protease in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **154**, 231-238.
- Conboy, J.G., Fenton, W.A., und Rosenberg, L.E.** (1982). Processing of pre-ornithine transcarbamylase requires a zinc-dependent protease localized to the mitochondrial matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 1-7.

- Daum, G., Gasser, S.M., und Schatz, G.** (1982). Import of proteins into mitochondria: Energy-dependent, two-step processing of the intermediate space enzyme cytochrome **b₂** by isolated yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 13075-13080.
- Deutsch, H.F.** (1967). Preparation of immunoglobulin concentrates. In "Methods in Immunology and Immunochemistry" (Williams, C.A., and Chase, M.W., eds.), 315-321.
- Dev, I.K., Harvey, R.J., und Ray, P.H.** (1985). Inhibition of prolipoprotein signal peptidase by globomycin. *J. Biol. Chem.* **260**, 5891-5894.
- Dev, I.K., und Ray, P.H.** (1984). Rapid assay and purification of a unique signal peptidase that processes the prolipoprotein from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **259**, 11114-11120.
- Dottavio-Martin, D., und Ravel, J.M.** (1978). Radiolabelling of proteins by reductive alkylation with (¹⁴C)formaldehyde and sodium cyanoborohydride. *Anal. Biochem.* **87**, 562-565.
- Eilers, M., und Schatz, G.** (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature (Lond.)* **322**, 549-555.
- Eilers, M., Oppliger W., und Schatz, G.** (1987) Both ATP and an energized inner membrane are required to import a purified precursor protein into mitochondria. *EMBO J.* **6**, 1073-1077.
- Emr, S.D., Vassarotti, A., Garrett, J., Geller, B.L., Takeda, M., und Douglas, M.G.** (1986). The amino terminus of the yeast F₁-ATPase β -subunit precursor functions as a mitochondrial import signal. *J. Cell. Biol.* **102**, 523-533.
- Evans, E.A., Gilmore, R., und Blobel, G.** (1986). Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 581-585
- Fahey, J.L.** (1967). Chromatographic separation of immunoglobulins. In "Methods in Immunology and Immunochemistry" (Williams, C.A., and Chase, M.W., eds.), 321-332.

- Fling, S.P., und Gregerson, D.S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155**, 83-88.
- Flügge, U.I., und Hinz, G. (1986). Energy dependence of protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **160**, 563-570.
- Freitag, H., Janes, M., und Neupert, W. (1982). Biosynthesis of mitochondrial porin and insertion into the outer mitochondrial membrane of *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **126**, 197-202.
- Gasser, S.M., Ohashi, A., Daum, G., Böhn, P.C., Gibson, J., Reid, G.A., Yonetani, T., und Schatz, G. (1982). Imported mitochondrial proteins cytochrome b₂ and cytochrome c₁ are processed in two steps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 267-271.
- Gasser, S.M., und Schatz, G. (1983). Import of proteins into mitochondria: in vitro studies on the biosynthesis of the outer membrane. *J. Biol. Chem.* **258**, 3427-3430.
- Gilbert, J.M., und Anderson, W.F. (1971). tRNA dependent cell-free hemoglobin synthesis. *Meth. Enzymol.* **XX**, 542-549.
- Gilmore R., Blobel, G. und Walter, P. (1982b). Protein translocation across the endoplasmic reticulum II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J. Cell Biol.* **95** 470-477.
- Gilmore, R., Blobel, G. und Walter, P. (1982a). Protein translocation across the endoplasmic reticulum I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J. Cell Biol.* **95**, 463-469.
- Goldberg, A.L., Sreedhara Swamy, K.H., Chung, C.H., Larimore, F.S. (1981) Proteases in *Escherichia coli*. *Meth. Enzym.* **80**.
- Hallermayer, G., Zimmermann, R., und Neupert, W., (1977). Kinetic studies on the transport of cytoplasmically synthesized proteins into the mitochondria in intact cells of *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **81**, 523-532.

- Hansen, W., Garcia, P.P., und Walter, P.** (1986). In vitro protein translocation in yeast endoplasmic reticulum: ATP-dependent post-translational translocation of the prepro- α factor. *Cell* **45**, 397-406.
- Harmey, M.A., und Neupert, W.** (1985). Synthesis and intracellular transport of mitochondrial proteins. In "The Enzymes of Biological Membranes" (Martonosi, A., ed.) Vol. **4**, 431-464. Plenum Publ. G., New York.
- Hartl, F.-U., Ostermann, J., Guiard, B., und Neupert, W.** (1987). Translocation into and out of the matrix: targetting of proteins to the mitochondrial intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell* **51**, 1027-1037.
- Hartl, F.-U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H., und Neupert, W.** (1986). Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S-protein of ubiquinol cytochrome c reductase. *Cell* **47**, 939-951.
- Hauri, H.P., und Bucher, K.** (1986). Immunoblotting with monoclonal antibodies: Importance of the blocking solution. *Anal. Biochem.* **159**, 386-389.
- Hay, R., Böhni, P., und Gasser, S.** (1984). How mitochondria import proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 65-87.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., und Rose, I.A.** (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1783-1786.
- Hortsch, M., Avossa, D., und Meyer, D.I.** (1986). Characterization of secretory protein translocation: ribosome-membrane interaction in endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **103**, 241-253.
- Horwich, A.L., Fenton, W.A., Williams K.R., Kalousek, F., Kraus, J.P., Doolittle, R.F., Konigsberg, W., und Rosenberg, L., E.** (1984). Structure and expression of a complementary DNA for the nuclear coded precursor of human mitochondrial ornithine transcarbamylase. *Science* **224**, 1068-1074.

- Horwich, A.L., Kalousek, F., Fenton, W.A., Pollock, R.A., und Rosenberg, L.E.** (1986). Targeting of pre-ornithine transcarbamylase to mitochondria: definition of critical regions and residues in the leader peptide. *Cell* **44**, 451-459.
- Horwich, A.L., Kalousek, F., Mellman, I., und Rosenberg, L.E.** (1985a). A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. *EMBO J.* **4**, 1129-1135.
- Horwich, A.L., Kalousek, F., und Rosenberg, L.E.** (1985b). Arginine in the leader peptide is required for both import and proteolytic cleavage of a mitochondrial precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4930-4933.
- Hough, R., Pratt, G., und Rechsteiner, M.** (1986). Ubiquitin-lysozyme conjugates: Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* **261**, 2400-2408.
- Hunt, T., und Jackson, R.J.** (1974). The rabbit reticulocyte lysate as a system for studying mRNA. *Modern Trends in Human Leukaemia: Biological, Biochemical and Virological Aspects* (Neth, R., Gallo, R.C., Spiegelman, S., und Stohlman, F.R. eds.) J.F. Lehmanns Verlag München, 300-307.
- Hurt, C.H., und van Loon, A.P.G.M.** (1986). How proteins find mitochondria and intermitochondrial compartments. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 204-207.
- Hurt, C.H., Allison, O.S., Müller, U., und Schatz, G.** (1987). Amino-terminal deletions in the presequence of an imported mitochondrial protein block the targeting function and proteolytic cleavage of the presequence at the carboxy terminus. *J. Biol. Chem.* **262**, 1420-1424.
- Hurt, E.C., Pesold-Hurt, B., Suda, K., Oppliger, W., und Schatz, G.** (1985). The first twelve amino acids (less than half of the pre-sequence) of an imported mitochondrial protein can direct mouse cytosolic dihydrofolate reductase into the yeast mitochondrial matrix. *EMBO J.* **4**, 2061-2068.

- Hurt, E.C., Pesold-Hurt, B., und Schatz, G. (1984). The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *FEBS Lett.* **178**, 306-310.
- Hussain, M., Ichihara, S., und Mizushima, S. (1982). Mechanism of signal peptide cleavage in the biosynthesis of the major lipoprotein of the *E.coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* **257**, 5177-5182.
- Hwang, B.J., Park, W.J., Chung, C.H., und Goldberg, A.L. (1987). *Escherichia coli* contains a soluble ATP-dependent protease (Ti) distinct from protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5550-5554.
- Ingham, K.C. (1984). Protein precipitation with polyethylene glycol. In *Methods Enzymol.* **104**, 351-356.
- Innis, M.A., Tokunaga, M., Williams, M.E., Loranger, J.M., Chang, S.Y., Chang, S., und Wu, H.C. (1984). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* prolipoprotein signal peptidase (*lsp*) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3708-3712.
- Jackson, R.C., und White, W.R. (1981). Phospholipid is required for the processing of presecretory proteins by detergent-solubilized canine pancreatic signal peptidase. *J. Biol. Chem.* **256**, 2545-2550.
- Kaput, J., Goltz, S., und Blobel, G. (1982). Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c peroxidase precursor: functional implications of the pre-sequence for protein transport into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 15054-15058.
- Kaschnitz, R., und Kreil, G. (1978). Processing of prepromellitin by intracellular fractions from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 901-907.
- Katayama-Fujimura, Y., Gottesman, S., und Maurizi, M.R. (1987). A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 4477-4485.
- Keng, T., Alani, E., und Guarente, L. (1986). The nine amino-terminal residues of δ -aminolevulinate synthase direct β -galactosidase into the mitochondrial matrix. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 355-364.

- Kirby, K.S.**, (1968). Isolation of nucleic acids with phenolic solvents. *Meth. Enzymol.* **XIIB**, 87-99.
- Kirwin, P.M., Elderfield, P.D., and Robinson, C.** (1987). Transport of proteins into chloroplasts: Partial purification of a thylakoidal processing peptidase involved in the plastocyanin biogenesis. *J. Biol. Chem.* **262**, 16386-16390.
- Knudsen, K.A.** (1985). Proteins transferred to nitrocellulose for use as immunogens. *Anal. Biochem.* **147**, 285-288.
- Korb, H., und Neupert, W.** (1978). Biogenesis of cytochrome c, transfer to mitochondria and conversion to holocytochrome c. *Eur. J. Biochem.* **91**, 609-620.
- Kumamoto, T., Ito, A., und Omura, T.** (1986). Characterization of a mitochondrial matrix protease catalyzing the processing of adrenodoxin precursor. *J. Biochem.* **100**, 247-254.
- Kurzchalia, T.V., Wiedman, M., Girshovich, A.S., Bochkareva, E.S., Bielka, H., und Rapoport, T.A.** (1986). The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54 kD polypeptide of signal recognition particle. *Nature (Lond.)* **320**, 634-636.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leaver, C.J., und Ingle, J.** (1971). The molecular integrity of chloroplasts ribosomal ribonucleic acid. *Biochem. J.* **123**, 235-243.
- Lewin, A.S., und Norman, D.K.** (1983). Assembly of F₁-ATPase in isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **258**, 6750-6755.
- Lively, M.O., und Walsh, K.A.** (1983). Hen oviduct signal peptidase is an integral membrane protein. *J. Biol. Chem.* **258**, 9488-9495.
- Locker, J., und Rabinowitz, M.** (1979). An overview of mitochondrial nucleic acids and biogenesis. *Meth. Enzymol.* **LVI**, 3-16.

- Locker, J., and Rabinowitz, M.** (1979). An overview of mitochondrial nucleic acids and biogenesis. *Meth. Enzymol.* **LVI**, 3-16.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.V., Farr, A.L., and Randall, R.J.** (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **103**, 265-275.
- McAda, P.C., and Douglas, M.G.** (1982). A neutral metallo-endoprotease involved in the processing of an F₁-ATPase subunit precursor in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 3177-3182.
- Mellgren, R.L.** (1987). Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *FASEB J.* **1**, 110-115.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M.R.** (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7035-7056.
- Meyer, D.I., and Dobberstein, B.** (1980). A membrane component essential for vectorial translocation of nascent proteins across the endoplasmic reticulum: requirement for its extraction and reassociation with the membrane. *J. Cell Biol.* **87**, 498-502.
- Miura, S., Amaya, Y., and Mori, M.** (1986). A metalloprotease involved in the processing of mitochondrial precursor proteins. *BBRC* **134**, 1151-1159.
- Miura, S., Mori, M., Amaya, Y., and Tatibana, M.** (1982). A mitochondrial protease that cleaves the precursor of ornithine carbamoyl transferase. *Eur. J. Biochem.* **122**, 641-647.
- Müller, M., Ibrahimi, I., Chang, C.N., Walter, P., and Blobel, G.** (1982). A bacterial secretory protein requires signal recognition particle for translocation across mammalian endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **257**, 11860-11863.
- Nguyen, M., Argan, C., Sheffield, W.P., Bell, A.W., Shields, D., and Shore, G.C.** (1987). A signal sequence domain essential for processing, but not import, of mitochondrial pre-ornithine carbamyl transferase. *J. Cell Biol.* **104**, 1193-1198.

Nicholson, D., und Neupert, W. (1988). Synthesis and assembly of mitochondrial proteins. In "Protein transfer and organelle biogenesis (R.C. Das and Robins, P.W., eds.), Academic Press, New York, in press.

Novak, P., Ray, H.P., und Dev, I.K. (1986) Localization and purification of two enzymes from *Escherichia coli* capable of hydrolyzing a signal peptide. *J. Biol. Chem.* **261**, 420-427.

O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., und O'Farrell, P.H. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**, 1133-1142.

Ohashi, A., Gibson, J., Gregor, I., und Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria: The precursor of cytochrome c₁ is processed in two steps, one of them heme-dependent. *J. Biol. Chem.* **257**, 13042-13047.

Ou, W., Ho, A., Morohushi, K., Fuji-Kuriyama, L., und Omura, T. (1986). Processing-independent in vitro translocation of cytochrome p-450 (sc) precursor across mitochondrial membranes. *J. Biochem.* **100**, 1287-1296.

Pain, D., Kanwar, Y.S., und Blobel, G. (1988). Identification of a receptor for protein import into chloroplasts and its localization to envelope contact zones. *Nature* **331**, 232-237.

Pain, D., und Blobel, G. (1987). Protein import into chloroplasts requires a chloroplast ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3288-3292.

Parish, C.R., Classon, B.J., Tsagaratos, J., Walker, I.D., Kirszbaum, L., und McKenzie, I.F.C. (1986). Fractionation of detergent lysates of cells by ammonium sulphate-induced phase separation. *Anal. Biochem.* **156**, 495-502.

Pelham, H.R.B., und Jackson, R.J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67**, 247-256.

Peterson, E.A., und Sober, H.A. (1961). In: *Biochemical preparations* (John Wiley & Sons, Inc., New York-London) **8**.

Pfaller, R., Freitag, H., Harmey, M.A., Benz, R., und Neupert, W. (1985). A water-soluble form of porin from the mitochondrial outer membrane of *Neurospora crassa*: properties and relationship of the biosynthetic precursor form. *J. Biol. Chem.* **260**, 8188-8193.

Pfaller, R., und Neupert, W. (1987). High-affinity binding sites involved in the import of porin into mitochondria. *EMBO J.* **6**, 2635-2642.

Pfanner, N., Hartl, F.-U., Guiard, B., und Neupert, W. (1987a). Mitochondrial precursor proteins are imported through a hydrophilic membrane environment. *Eur. J. Biochem.* **169**, 289-293.

Pfanner, N., Tropschug, M., und Neupert, W. (1987b). Mitochondrial protein import: Nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. *Cell* **49**, 815-823.

Pfanner, N., und Neupert, W. (1985). Transport of proteins into mitochondria: A potassium diffusion potential is able to drive the import of ADP/ATP carrier. *EMBO J.* **4**, 2819-2825.

Pfanner, N., und Neupert, W. (1987a). Biogenesis of mitochondrial energy transducing complexes. In "Current Topics in Bioenergetics" (C.P. Lee, ed.), Vol. **15**, 177-219. Academic Press, New York, in press.

Pfanner, N., und Neupert, W. (1987b). Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **262**, 7528-7536.

Pfeffer, S.R., und Rothman, J.E. (1987). Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and golgi. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 829-852.

Pontremoli, S., und Melloni, E. (1986). Extralysosomal protein degradation. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 455-481.

Pratje, E., Mannhaupt, G., Michaelis, G., und Beyreuther, K. (1983). A nuclear mutation prevents processing of a mitochondrially encoded membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **2**, 1049-1054.

- Pratje, E., und Guiard, B.** (1986). One nuclear gene controls the removal of transient pre-sequences from two yeast proteins: one encoded by the nuclear the other by the mitochondrial genome. *EMBO J.*, **5**, 1313-1317.
- Rassow, J.** (1987). cDNA-Klonierung und Import mitochondrialer Proteine von *Neurospora crassa*. Diplomarbeit
- Reid, G.A., Yonetani, T., und Schatz, G.** (1982). Import of proteins into mitochondria: Import and maturation of the mitochondrial intermembrane space enzymes cytochrome **b₂** and cytochrome **c** peroxidase in intact yeast cells. *J. Biol. Chem.* **257**, 13068-13074.
- Robinson, A., Kaderbhai, M.A., und Austen, B.M.** (1987). Identification of signal sequence binding proteins integrated into the rough endoplasmic reticulum membrane. *Biochem. J.* **242**, 767-777.
- Robinson, A., und Austen, B.,** (1987). The role of topogenic sequences in the movement of proteins through membranes. *Biochem. J.* **246**, 249-261.
- Robinson, C., und Ellis, R.J.** (1984). Transport of proteins into chloroplasts: partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of imported precursor polypeptides. *Eur. J. Biochem.* **142**, 337-342.
- Rogers, S., Wells, R., und Rechsteiner, M.** (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Roise, D., Horvath, S.J., Tomich, J.M., Richards, J.H., und Schatz, G.** (1986). A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers. *EMBO J.* **5**, 1327-1334.
- Rothblatt, J.A., und Meyer, D.I.** (1986). Translocation and glycosylation of prepro- α factor in vitro can occur via an ATP-dependent post-translational mechanism. *EMBO J.* **6**, 3455-3463.

- Sagara, Y., Ito, A., und Omura, T.** (1984). Partial purification of a metalloprotease catalyzing the processing of adrenodoxin precursor in bovine adrenal cortex mitochondria. *J. Biochem.* **96**, 1743-1752.
- Schleyer, M., Schmidt, B., und Neupert, W.** (1982). Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **125**, 109-116.
- Schleyer, M., und Neupert, W.** (1985). Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell* **43**, 339-350.
- Schmidt, B., Wachter, E., Sebald, W., und Neupert, W.** (1984). Processing peptidase of *Neurospora* mitochondria. Two-step cleavage of imported ATPase subunit 9. *Eur. J. Biochem.* **144**, 581-588.
- Schwartz, T.W.** (1986). The processing of peptide precursors. *FEBS Lett.* **200**, 1-9.
- Sebald, W., Neupert, W., und Weiss, H.** (1979). Preparation of *Neurospora* mitochondria. *Methods Enzymol.* **55F**, 144-148.
- Sidhu, A., und Beattie, D.S.** (1983). Kinetics of assembly of complex III into the yeast mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **258**, 10649-10656.
- Siegel, V., und Walter, P.** (1988). Each of the activities of signal recognition particle (SRP) is contained within a distinct domain: analysis of biochemical mutants of SRP. *Cell* **52**, 39-49.
- Stern, J.B., und Jackson, R.C.** (1985). Peptide products of the cleavage of bovine preprolactin by signal peptidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **237**, 244-252.
- Swamy, K.H.S., und Goldberg, A.** (1981). *E.coli* contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP-dependent. *Nature* **292**, 652-654.
- Sztul, E.S., Hendrick, J.P., Kraus, J.P., Wall, D., Kalousek, F., und Rosenberg, L.E.** (1987). Import of rat ornithine transcarbamylase precursor into mitochondria: two-step processing of the leader peptide. *J. Cell Biol.* **105**, 2631-2639.

- Tajima, S., Lauffer, L., Rath, V.L., und Walter, P. (1986).** The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J. Cell Biol.* **103**, 1167-1178.
- Takeda, M., Vassarotti, A., und Douglas, M.G. (1985).** Nuclear genes coding the yeast mitochondrial triphosphatase complex. Primary sequence analysis of ATP2 encoding the F₁-ATPase β -subunit precursor. *J. Biol. Chem.* **260**, 15458-15465.
- Talmadge, K., Kaufman, J., und Gilbert, W. (1980).** Bacteria mature preproinsulin to insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 3988-3992.
- Teintze, M., Slaughter, M., Weiss, H., und Neupert, W. (1982).** Biogenesis of mitochondrial ubiquinol:cytochrome c reductase (cytochrome bc₁ complex). *J.Biol. Chem.* **257**, 10364-10371.
- Tobin, E.M., und Silverthorne, J. (1985).** Light regulation of gene expression in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 569-593.
- Tokunaga, M., Loranger, J.M., und Wu, H. (1984).** Prolipoprotein modification and processing enzymes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**, 3825-3830.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacryl amide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350-4354.
- Tzagoloff, A., und Myers, A.M. (1986).** Genetics of mitochondrial biogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 249-285.
- v.Heijne, G. (1984).** How signal sequences maintain cleavage specificity. *J. Mol. Biol.* **173**, 243-251.
- v.Heijne, G. (1986a).** Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* **5**, 1335-1342.

- v.Heijne, G. (1986b). Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J. Mol. Biol.* **189**, 239-242.
- Vassarotti, A., Chen, W.-J., Smagula, C., und Douglas, M.G. (1987a). Sequences distal to the mitochondrial targeting sequences are necessary for the maturation of the F₁-ATPase β -subunit precursor in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **262**, 411-418.
- Vassarotti, A., Stroud, R., und Douglas, M. (1987b). Independent mutations at the amino terminus of a protein act as surrogate signals for mitochondrial import. *EMBO J.* **6**, 705-711.
- Viebrock, A., Perz, A., und Sebald, W. (1982). The imported preprotein of the proteolipid subunit of the mitochondrial ATP synthase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and sequencing of the mRNA. *EMBO J.* **1**, 565-571.
- Vimr, E.R., Green, L., und Miller, C.G. (1983). Oligopeptidase deficient mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **153**, 1259-1265.
- Wachter, E., Machleidt, W., Hofner, H., und Otto, J. (1973). Aminopropyl glass and its p-phenylene diisothiocyanate derivatives, a new support in solid-phase Edman degradation of peptides and proteins. *FEBS Lett.* **35**, 97-102.
- Walter, P., und Blobel, G. (1980). Purification of a membrane associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7112-7116.
- Waters, M.G., und Blobel, G. (1986). Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur post-translationally and requires ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.* **102**, 1543-1550.
- Watts, C., Wickner, W., und Zimmermann, R. (1983). M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2809-2813.
- Wiedman, M., Kurzchalia, T.V., Bielka, H., und Rapoport, T.A. (1987 a). Direct probing of the interaction between the signal sequence of nascent preprolactin and the signal recognition particle by specific cross-linking. *J. Cell Biol.* **104**, 201-208.

- Wiedmann, M., Kurzchalia, T.V., Hartmann, E., und Rapoport, T.A. (1987 b). A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane. *Nature* **328**, 830-833.
- Witte, C., Jensen, R.E., Yaffe, M.P. und Schatz, G. (1988). MAS 1, a gene essential for yeast mitochondrial assembly, encodes a subunit of the mitochondrial processing protease. *EMBO J.* **7**, 1439-1447.
- Weiss, H., v.Jagow, G., Klingenberg, M., und Bücher, T. (1970). Characterization of *Neurospora crassa* mitochondria prepared with a grind-mill. *Eur. J. Biochem.* **14**, 75-82.
- Wolfe, P.B., Wickner, W., und Goodman, J.M. (1983a). Sequence of the leader peptidase gene of *Escherichia coli* and the orientation of the leader peptidase in the bacterial envelope. *J. Biol. Chem.* **258**, 12073-12080.
- Wolfe, P.B., Zwizinski, C., und Wickner, W. (1983b). Purification and characterization of leader peptidase from *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* **97**, 40-46.
- Yaffe, M.P., Ohta, S., und Schatz, G. (1985). A yeast mutant temperature-sensitive for mitochondrial assembly is deficient in a mitochondrial protease activity that cleaves imported precursor polypeptides. *EMBO J.* **4**, 2069-2074.
- Yaffe, M.P., und Schatz, G. (1984). Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **81**, 4819-4823.
- Yoshida, H., Tondokoro, N., Asano, Y., Mizusawa, K., Yamagishi, R., Horigome, T., und Sugano, H. (1987). Studies on membrane proteins involved in ribosome binding on the rough endoplasmic reticulum. Ribophorins have no ribosome-binding activity. *Biochem. J.* **245**, 811-819.
- Zimmermann, R., Hennig, B., und Neupert, W. (1981). Different transport pathways of individual precursor proteins in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **116**, 455-460.
- Zwizinski, C., Schleyer, M., und Neupert, W. (1983). Transfer of proteins into mitochondria: precursor to the ADP/ATP carrier binds to receptor sites on isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **258**, 4071-4074.

Zwizinski, C., und Neupert, W. (1983). Precursor proteins are transported into mitochondria in the absence of proteolytic cleavage of the additional sequences. *J. Biol. Chem.* **258**, 13340-13346.

Zwizinski, C., und Wickner, W. (1980). Purification and characterisation of leader (signal) peptidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 7973-7977

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem geschätzten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Dr. Neupert für seine ständige Diskussionsbereitschaft, für konstruktive Denkanstöße und für sein motivierendes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Danken will ich auch Herrn Prof. Dr. Linzen für wertvolle und hilfreiche Anregungen und für die Ermöglichung der Durchführung der Dissertation am Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Dank und Anerkennung gebührt Frau Marlies Braun für ihre tatkräftige Unterstützung.

Diese Arbeit sei zudem eine Erinnerung an zahlreiche und fruchtbare Diskussionen mit Dr. R. Pfaller, Dr. B. Schmidt, Dr. U. Hartl, Dr. D. Nicholson, Dr. N. Pfanner, R. Stuart, C. Hergersberg, K. Mahlke, J. Rassow, R. Kleene, G. Müller, G. Schlenstedt, H. Wiech, J. Ostermann, Dr. R. Zimmermann, Dr. M. Tropschug. Ihnen und allen anderen Mitarbeiter dieses Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich herzlich danken.

LEBENS LAUF

PERSONALIEN: Gerhard Hawlitschek-Lohmaier

geb. 24.06.1956 in Burghausen

Staatsangehörigkeit deutsch

verheiratet mit der Ärztin Dipl.biol. Eva Lohmaier,

Tochter Johanna (geb. 31.12.1986)

ELTERN: Josef Hawlitschek, Werkstoffprüfer

Ingrid Hawlitschek, geb. Hanke, Näherin

SCHULBILDUNG: 1962-1966, Grundschule Burghausen/Alz

1966-1975, Aventinus-Gymnasium Burghausen mit Abschluß der
Allgemeinen Hochschulreife

WEHRDIENST: 1975-1976, Wehrpflicht in Pocking/Ndb.

HOCHSCHULAUSBILDUNG: 1976-1984, Studium der Biologie an der

Ludwig-Maximilians-Universität

München; Fächer: Zoologie, Genetik und Biochemie, Abschluß als

Diplombiologe, Diplomarbeit bei PD. Dr. D.Weiß, Thema: *Schneller axonaler
Transport löslicher und partikulärer Proteine*

1984, Beginn der Arbeit zur vorliegenden Dissertation bei

Prof. Dr. Dr. W. Neupert am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische
Biochemie und Zellbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

